

Utilização de técnicas de extração de compostos voláteis como ferramentas taxonómicas

Ana Margarida das Neves
Cruz Gomes Bonnet

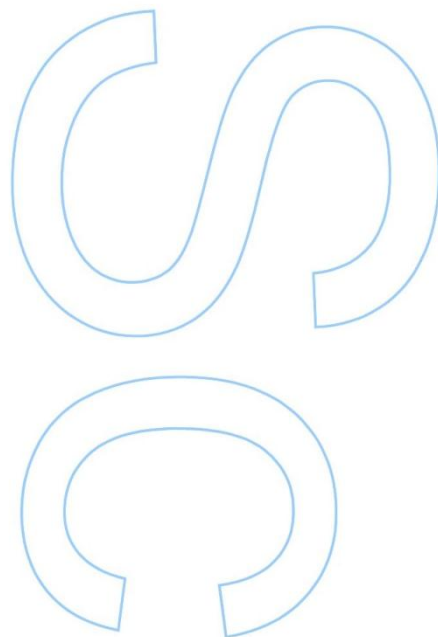
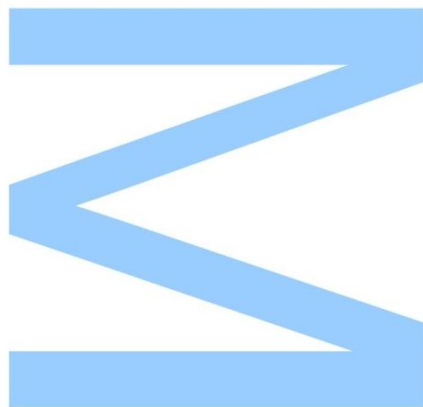
Mestrado em Ecologia, Ambiente e Território
Departamento de Biologia
2013

Orientador

Rubim Almeida, Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Coorientador

Luís Gonçalves, Investigador Pós-Doutoramento, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

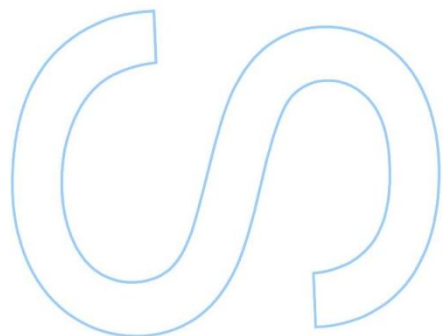
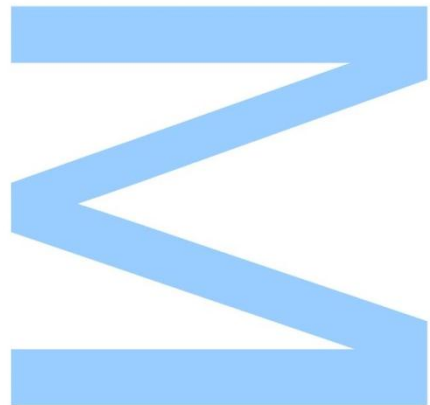




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Ao Professor Doutor Rubim Almeida, meu orientador, pela disponibilidade, orientação, cuidado, incentivo, auxílio e por todos os conhecimentos transmitidos durante este trabalho, sem os quais não teria sido possível a sua realização.

Ao Doutor Luís Gonçalves, meu co-orientador, pelos ensinamentos, atenção, ânimo, acompanhamento na realização do trabalho e apoio constante em todas as suas fases.

A todos os colegas do grupo QuAQuA e ao Professor Doutor José António Rodrigues, pela oportunidade, amabilidade, simpatia e por toda a ajuda prestada.

Às minhas amigas, por me acompanharem nesta caminhada.

À minha família, principalmente os meus pais, pelo amor, ajuda e troca de ideias.

Obrigado a todos

Resumo

Coincya johnstonii (Samp.) Greuter & Burdet é uma espécie pertencente à família **Brassicaceae**, uma família extremamente importante a vários níveis. O género *Coincya* habita a Europa Ocidental e o Norte de África, e *Coincya johnstonii* em particular é endémica do Litoral Norte de Portugal. No entanto, a sua identidade taxonómica não se encontra completamente estabelecida, e na maioria das vezes é considerada como uma variedade e não uma espécie independente.

Nos últimos anos têm sido muitos os estudos relativos a compostos voláteis presentes em plantas. Duas das técnicas mais usadas neste tipo de análises são SPME (Microextração em Fase Sólida) e GC-MS (Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa). No entanto, tanto quanto é do nosso conhecimento, essas técnicas não foram ainda usadas, neste género, numa perspetiva taxonómica.

O primeiro objetivo deste trabalho é determinar se há alguma correlação entre os compostos voláteis emitidos pelas plantas e a sua classificação taxonómica. O segundo objetivo é determinar se *Coincya johnstonii*, espécie principal aqui em estudo, é ou não uma espécie independente. Para efeitos de comparação, analisaram-se também as espécies *Raphanus raphanistrum* e *Hirschfeldia incana*.

Abstract

Coincya johnstonii (Samp.) Greuter & Burdet is a species belonging to the family **Brassicaceae**, an extremely important family on several levels. The genus *Coincya* inhabits Western Europe and Northern Africa, and *Coincya johnstonii* in particular is endemic of the northern coastal area of Portugal. However, its taxonomic identity is not completely established, being considered most of the times as a variety, and not as an independent species.

In the last years there have been many studies presenting research on volatile compounds present in plants. Two of the most used techniques in this type of analysis are SPME (Solid Phase Microextraction) and GC-MS (Gas Chromatography – Mass Spectrometry). However, as far as we know, these techniques have not yet been used, in this genus, in a taxonomic perspective.

The first objective of this work is to determine if there's any correlation between the volatile compounds emitted by the plants and their taxonomic classification. The second objective is to determine if *Coincya johnstonii*, primary species being studied here, is or is not an independent species. For comparison, there have also been analyzed the species *Raphanus raphanistrum* and *Hirschfeldia incana*.

Índice

| | |
|--|----|
| Agradecimentos | 3 |
| Resumo | 4 |
| Abstract | 5 |
| Índice | 6 |
| Índice de Figuras | 8 |
| Índice de Tabelas | 10 |
| Lista de Abreviaturas | 11 |
| I. Introdução Teórica..... | 12 |
| 1. Espécies estudadas | 13 |
| 1.1. Brassicaceae..... | 13 |
| 1.1.1. <i>Coincya johnstonii</i> | 14 |
| 2. Métodos de extração e identificação de compostos | 17 |
| 2.1. Introdução | 17 |
| 2.2. SPME | 17 |
| 2.3. GC-MS | 20 |
| 3. Objectivos do trabalho | 23 |
| II. Parte Experimental..... | 25 |
| 1. Instrumentação | 26 |
| 1.1. Para SPME:..... | 26 |
| 1.2. Para GC-MS:..... | 26 |
| 2. Procedimento experimental | 27 |
| 2.1. Introdução | 27 |
| 2.2. SPME | 28 |
| 2.3. GC-MS | 29 |
| 3. Resultados..... | 30 |
| 3.1. Introdução | 30 |
| 3.2. Resultados relativos à espécie <i>Coincya johnstonii</i> | 31 |
| 3.3. Resultados relativos à espécie <i>Raphanus raphanistrum</i> | 37 |

| | |
|--|----|
| 3.4. Resultados relativos à espécie <i>Hirschfeldia incana</i> | 43 |
| 3.5. Discussão | 49 |
| Conclusão | 54 |
| Propostas de Trabalho Futuro | 56 |
| Referências Bibliográficas..... | 57 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Fig. 1 – Representação esquemática de um dispositivo de SPME..... | 18 |
| Fig. 2 - Comparação esquemática entre SPME por imersão e HS-SPME..... | 18 |
| Fig. 3 - Coluna de cromatografia gasosa | 20 |
| Fig. 4 - Esquema de um cromatograma | 21 |
| Fig. 5 - Cromatograma resultante da análise da espécie <i>Coincya johnstonii</i> com a fibra de PDMS/DVB a uma temperatura de 50°C..... | 31 |
| Fig. 6 - Cromatograma resultante da análise da espécie <i>Coincya johnstonii</i> com a fibra de CAR/PDMS a uma temperatura de 50°C | 32 |
| Fig. 7 - Cromatograma resultante da análise da espécie <i>Coincya johnstonii</i> com a fibra de PDMS a uma temperatura de 50°C..... | 33 |
| Fig. 8 - Sobreposição dos cromatogramas resultantes da análise da espécie <i>Coincya johnstonii</i> com as fibras de PDMS, CAR/PDMS e PDMS/DVB a uma temperatura de 50°C | 34 |
| Fig. 9 - Cromatograma resultante da análise da espécie <i>Raphanus raphanistrum</i> com a fibra de PDMS/DVB a uma temperatura de 50°C..... | 37 |
| Fig. 10 - Cromatograma resultante da análise da espécie <i>Raphanus raphanistrum</i> com a fibra de CAR/PDMS a uma temperatura de 50°C..... | 38 |
| Fig. 11 - Cromatograma resultante da análise da espécie <i>Raphanus raphanistrum</i> com a fibra de PDMS a uma temperatura de 50°C | 39 |
| Fig. 12 - Sobreposição dos cromatogramas resultantes da análise da espécie <i>Raphanus raphanistrum</i> com as fibras de PDMS, CAR/PDMS e PDMS/DVB a uma temperatura de 50°C..... | 40 |

| | |
|---|----|
| Tabela 3 - Conjunto dos compostos encontrados nas análises à espécie <i>Raphanus raphanistrum</i> | 41 |
| Fig. 13 - Cromatograma resultante da análise da espécie <i>Hirschfeldia incana</i> com a fibra de PDMS/DVB a uma temperatura de 50°C..... | 43 |
| Fig. 14 - Cromatograma resultante da análise da espécie <i>Hirschfeldia incana</i> com a fibra de CAR/PDMS a uma temperatura de 50°C | 44 |
| Fig. 15 - Cromatograma resultante da análise da espécie <i>Hirschfeldia incana</i> com a fibra de PDMS a uma temperatura de 50°C | 45 |
| Fig. 16 - Sobreposição dos cromatogramas resultantes da análise da espécie <i>Hirschfeldia incana</i> com as fibras de PDMS, CAR/PDMS e PDMS/DVB a uma temperatura de 50°C..... | 46 |

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Combinação de parâmetros utilizados para distinguir os taxa infraespecíficos de <i>Coincya monensis</i> subsp. cheiranthos..... | 16 |
| Tabela 2 - Conjunto dos compostos encontrados nas análises à espécie <i>Coincya johnstonii</i> | 35 |
| Tabela 3 - Conjunto dos compostos encontrados nas análises à espécie <i>Raphanus raphanistrum</i> | 41 |
| Tabela 4 - Conjunto dos compostos encontrados nas análises à espécie <i>Hirschfeldia incana</i> | 47 |
| Tabela 5 - Lista de compostos encontrados nas três espécies estudadas | 50 |
| Tabela 6 - Lista de compostos encontrados em mais do que uma espécie..... | 53 |

Lista de Abreviaturas

| | |
|--------------|--|
| SPME | Solid Phase Microextraction (Microextração em Fase Sólida) |
| GC-MS | Gas Chromatography – Mass Spectrometry (Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa) |

I. Introdução Teórica

1. Espécies estudadas

1.1. Brassicaceae

O presente trabalho reporta-se ao estudo de *Coinceya johnstonii*, membro da família Brassicaceae. A família Brassicaceae (Cruciferae) é de indiscutível interesse, quer a nível agronómico quer a nível científico. A ela pertencem não só um grande número de espécies de elevada importância alimentar (particularmente no género *Brassica*) como ainda vários organismos-modelo para a biologia e a genética, como por exemplo a bastante conhecida *Arabidopsis thaliana*. É uma grande família, com mais de 330 géneros e 3700 espécies reconhecidas [1].

O interesse agronómico nesta família advém do facto de que muitas das suas espécies são, pelo menos em parte, comestíveis. Algumas têm até várias partes comestíveis. Estas podem ser a raiz, como no caso do rabanete (*Raphanus sativus*), as folhas, como a couve-galega (*Brassica oleracea*, grupo *Acephala*), a penca (*Brassica oleracea*, grupo *Costata*) ou a rúcula (*Eruca sativa*), as flores, como a couve-flor e o romanesco (ambos *Brassica oleracea*, grupo *Botrytis*) e até as gemas, como a couve-de-bruxelas (*Brassica oleracea*, grupo *Gemmifera*). Uma espécie com várias partes comestíveis é por exemplo o nabo (*Brassica rapa*). Enquanto a planta ainda é jovem, a sua parte comestível são as folhas. Mais tarde, para além das folhas adultas, torna-se comestível também a raiz, o “nabo” propriamente dito. Acresce que as sementes de algumas espécies, depois do devido processamento, dão origem a temperos, como por exemplo a mostarda (proveniente de várias espécies dos géneros *Brassica* e *Sinapis*) e o wasabi (*Wasabia japonica*).

Outras espécies desta família são usadas como plantas ornamentais: por exemplo *Cardamine pratensis* (agrião-dos-prados), *Matthiola incana* (goivo-encarnado), *Erysimum cheiri* (aleli), *Lunaria annua* (moedas-do-papa) ou até *Brassica oleracea*, grupo *Acephala* (repolho-ornamental).

Diversas espécies têm ainda usos distintos. As sementes de colza (*Brassica napus*) são uma fonte de biodiesel. A partir das folhas de *Isatis tinctoria* (pastel) é possível extrair pigmento azul [2, 3].

Com um tão grande número de espécies a serem tão úteis ao Homem, esta família tem sido amplamente estudada. No entanto, apesar de todos esses estudos, a taxonomia das tribos e géneros que a integram é ainda motivo de debate [1].

De acordo com Fay et al. (2010), Capparaceae, Cleomaceae e Brassicaceae formam um clado robusto e, juntas, incluem a maioria das espécies economicamente importantes das Brassicales. Assim, o conceito de Brassicaceae usado neste trabalho inclui esta nova integração daqueles taxa na família Brassicaceae, tal como proposto por Stevens, (2012) [4, 5].

1.1.1. *Coincya johnstonii*

Coincya johnstonii (Samp.) Greuter & Burdet (BRASSICACEAE) é um endemismo exclusivamente lusitano, sendo a sua localização restrita às dunas do litoral do Distrito do Porto. Relativamente rara, com populações ocorrendo pontualmente entre a Aguçadoura (concelho da Póvoa de Varzim) e Aguda (concelho de Vila Nova de Gaia), é um caso de adaptação ao ambiente dunar, o qual apresenta um hábito nitidamente suculento, o que a distingue das restantes espécies do género.

De estatuto específico próprio, esta planta foi sendo transferida, ao longo de quase cem anos, para várias categorias de nível inferior, esquecendo características repetidas por todos os autores que a estudaram e que as diferenciam das outras espécies do género: hábito prostrado, presença de pêlos escamiformes no caule, textura coriácea das folhas basais, dimensões da silíqua e do rostro, bem como número cromossómico, entre outros caracteres.

Descrita por Gonçalo Sampaio em 1906, como *Brassica johnstonii* Samp., foi transferida em 1963, pelo botânico inglês Vernon Heywood, para o género *Rhynchosinapis*, mantendo o epíteto específico do basiónimo [6, 7].

Em 1983, os botânicos Greuter & Burdet procedem a nova transferência, mudando a espécie para o género *Coincya* Rouy [8]. Leadlay, em 1990, dá-lhe um

novo estatuto, atribuindo a categoria subespecífica *Coincya monensis* subsp. *recurvata* var. *johnstonii* (Samp.) Leadlay [9].

No âmbito da revisão da família, realizada para o Projecto Flora Ibérica (C.S.I.C.), é efectuada nova alteração no estatuto do taxon, sendo-lhe conferido o estatuto de variedade subespecífica *Coincya monensis* (L) Greuter & Burdet subsp. *cheiranthos* var. *johnstonii* Leadlay, por não lhe reconhecer o autor variabilidade suficiente para que lhe fosse atribuída a categoria de espécie [10].

O nome do taxon deve-se a uma homenagem que o botânico português, Gonçalo Sampaio, quis prestar ao amigo e botânico Edwin Johnston (Sampaio, 1905).

Sampaio faz-nos uma descrição detalhada das principais características desta espécie: “Raíz forte, bisannual ou perenne; caules prostrados ou decaídos, geralmente compridos, simples ou só ramosos na base, retorso-híspidos na parte inferior; folhas todas ou quasi todas radicaes, pequenas, sempre lyradas, com os segmentos laterais inteiros, muito híspidos, grossas e quasi sempre um pouco carnosas; sépalas com 6-7 millímetros de comprido, piloso-híspidas no cimo, com bordo escarioso e sempre erectas; pétalas de limbo oval, levemente amarellas ou abrancadas, com veios violáceos muito acentuados na página inferior; cacho fructífero muito alongado, occupando quasi todo o comprimento do caule, desde a base ou perto da base, com os pedículos grossos, aberto-ascendentes, de 4-9 mill. de comprido; síliquas aberto-ascendentes ou subpatentes, de 3-4 ½ centímetros de longo, fortemente 3-nervadas, mais ou menos achatadas, com o bico ensiforme, comprido, excedendo muito ⅓ do comprimento das válvulas e normalmente egualando ½ d’esse comprimento; sementes globosas, ruivo-escuras, chagrinadas.” [6]

A acrescentar às já mencionadas características, a espécie em questão distingue-se das suas congéneres pelo número cromossómico, tratando-se da única espécie do género que é tetraplóide, pelo tamanho da síliqua e rostro, indumento constituído por pêlos em geral escamiformes, pelo hábito prostrado e pela textura coriácea [9].

Como já referido, pode ser encontrada nas dunas dos areais marítimos de Matosinhos, no Prado e entre Leça e Boa Nova e em Gaia, ao sul de Lavadores (Sampaio, 1905). Ocupa portanto, uma área geográfica muito restrita, sendo um endemismo exclusivo do litoral da Área Metropolitana do Porto [11].

Tabela 1 - Combinação de parâmetros utilizados para distinguir os taxa infraespecíficos de *Coincya monensis* subsp. *cheiranthos*. Adaptado de Leadlay e Heywood, 1990 [9]

| | Variedades | | | |
|-------------------------------|--|--------------------------------------|---|--|
| Características | var. <i>recurvata</i> | var. <i>johnstonii</i> | var. <i>setigera</i> | var. <i>granatensis</i> |
| Duração | Anual a perene | Anual a perene de vida-curta | Anual a trienal | Anual a trienal |
| Hábito | Ereto | Prostrado a ascendente | Ereto | Ereto a ascendente |
| Caule, altura (cm) | (8.5-) 10-100 | 10-60 | 35-100 | 35-80 |
| Caule, indumento | Híspido | Híspido | Glabro | Híspido |
| Folha basal, forma | Penatipartidas a penatissectas | Penatissectas a lirado-penatissectas | Lirado-penatissecta | Lirado-penatissecta a penatipartida-penatissecta |
| Folha basal, consistência/cor | (Dados não disponíveis) | Coriácea | Glauca | (Dados não disponíveis) |
| Folha, indumento | Híspido | Híspido | Híspido | Híspido |
| Pétalas, cor | Amarelo | Amarelo | Amarelo | Amarelo |
| Pétalas, cor das veias | Castanho ou púrpura | Castanho ou púrpura | Amarelo | Púrpura |
| Pedicelo, hábito | Ascendente a patente | Ascendente a patente | Ascendente a patente | Ascendente a ereto |
| Silíqua, forma | Direita, raramente curvada | Direita | Direita | Direita |
| Porção valvar, comp. (mm) | ---- | 18-33 | 18-40 | 25-35 |
| Rostro, comp. (mm) | (5-) 7-23 | (8-) 10-20 | (5-) 8-15 (-18) | (19-) 26 (-34) |
| Nº de cromossomas | 2n= 24, 48 | 2n= 48 | 2n= 24 | 2n= 24 |
| Localização | Dunas marítimas, leitos arenosos de rios, falésias e ladeiras rochosas | Dunas marítimas | Rochas silíceas | Rochas calcárias ou peridotíticas |
| Altitude | 0-2200 m | --- | 700-1000 (1300) m | 600-800 m |
| Distribuição | Grande parte de Espanha e Portugal | NW Portugal | Cordilheira Cantábrica, Montes de León e montanhas interiores da Galiza | Sul de Espanha |

2. Métodos de extração e identificação de compostos

2.1. Introdução

Existe um grande número de métodos, desde os clássicos até aos desenvolvidos mais recentemente, que permitem a extração de compostos orgânicos voláteis a partir de diversos tipos de amostras. Existem também vários métodos para a análise e identificação de compostos. Os procedimentos escolhidos para a realização deste trabalho são apresentados de seguida.

2.2. SPME

A SPME (Solid Phase Microextraction - Microextração em Fase Sólida) é uma técnica desenvolvida em 1990 para extração de analitos de amostras [12].

Consiste no uso de uma fibra recoberta por um polímero para a adsorção dos compostos voláteis ou semi-voláteis presentes na amostra. A fibra está dentro de uma agulha com um êmbolo, e é presa a um cabo. Ao pressionar o êmbolo, a fibra é exposta, e adsorve os compostos que a rodeiam. Após um determinado período de tempo é novamente recolhida e fica pronta para posterior análise dos compostos [13]. A Fig. 1 representa um esquema de uma fibra de SPME.

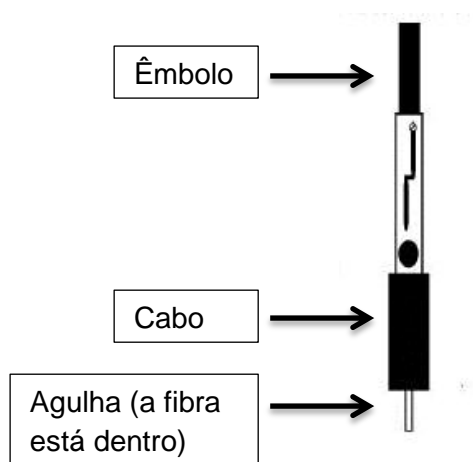


Fig. 1 – Representação esquemática de um dispositivo de SPME

Esta técnica pode ser usada de duas formas: a fibra pode adsorver os compostos do *headspace* (HS; fase gasosa acima da fase líquida ou sólida da amostra, em espaço fechado) ou diretamente por imersão na amostra líquida [13]. A Fig. 2 representa um esquema das duas possíveis formas de SPME: imersão e *headspace*.

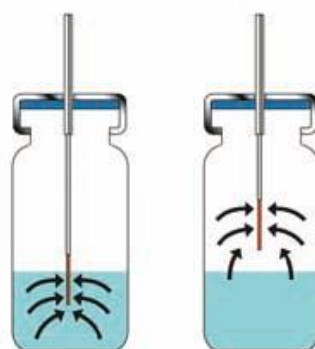


Fig. 2 - Comparação esquemática entre SPME por imersão e HS-SPME

Neste trabalho usou-se HS-SPME. Tem vantagens significativas em relação à imersão, como um menor sinal de fundo e uma maior durabilidade para a fibra. O maior tempo de vida deve-se ao facto de a fibra não estar em contacto direto com a amostra. Isto significa que não é afetada por constituintes ou características da amostra que poderiam ser desfavoráveis à fibra, como compostos de elevada massa molecular ou o pH [13].

São comercializadas várias fibras de SPME, que diferem entre si principalmente no polímero (fase estacionária) que as recobre. Este pode estar em

estado líquido ou sólido poroso e pode ter várias espessuras. A escolha da fibra a usar é geralmente feita com base na afinidade do polímero que a reveste para um determinado tipo de compostos, os que se espera/quer obter. Considerando também a espessura do polímero, de um modo geral, usam-se polímeros espessos para compostos voláteis e polímeros menos espessos para compostos semi-voláteis [13].

Neste trabalho foram usadas a fibra de PDMS (polidimetilsiloxano), a de PDMS/DVB (polidimetilsiloxano/divinilbenzeno) e a de CAR/PDMS (carboxeno/polidimetilsiloxano). PDMS, sendo um polímero apolar, é apropriado para compostos apolares. É um filme líquido. PDMS/DVB e CAR/PDMS são mais adequados para compostos polares, e são sólidos porosos [13, 14].

Para além do polímero de revestimento e sua espessura, a extração dos compostos é também afetada por outros parâmetros, como a concentração inicial do analito na amostra e a sua temperatura e, no caso de uma amostra líquida, a sua agitação e a adição de sais [13].

A técnica de SPME tem várias vantagens quando comparada com técnicas clássicas de extração, sendo as principais:

- ♦ Uma única etapa – mais fácil e mais rápido;
- ♦ Fácil automatização (adaptação a um sistema de auto-amostragem);
- ♦ Reutilização da fibra;
- ♦ Pequeno volume da amostra necessário;
- ♦ O facto de não serem necessários solventes;
- ♦ A possibilidade do uso de amostras em fase sólida, líquida ou gasosa;
- ♦ Menos dispendiosa.

Amostras preparadas por SPME podem ser subsequentemente analisadas por GC-MS (cromatografia gasosa com espectrometria de massa), LC-MS (cromatografia líquida com espectroscopia de massa) ou HPLC (cromatografia líquida de alta performance) [13].

A técnica de SPME tem sido usada com sucesso para a determinação dos compostos voláteis de outras espécies da família Brassicaceae, de outros alimentos e de outras substâncias diferentes [14-16].

2.3. GC-MS

A GC-MS (Gas Chromatography – Mass Spectrometry - Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa) é uma técnica de separação e identificação de amostras. É especialmente útil para amostras complexas, com muitos componentes, embora possa também ser usada para verificar a pureza de um composto.

É constituída por dois elementos: o cromatógrafo gasoso e o espectrómetro de massa. A fibra de SPME é injetada no cromatógrafo, que consiste numa coluna capilar de comprimento, diâmetro e espessura variáveis, onde os compostos são desadsorvidos da fibra e transportados por um gás inerte ou não-reativo (fase móvel) ao longo da coluna, que os separa e retém no polímero que reveste o seu interior (fase estacionária) durante períodos de tempo diferentes. Na Fig. 3 está representada uma coluna de GC.



Fig. 3 - Coluna de cromatografia gasosa

A retenção é feita com base nas propriedades da coluna (comprimento, diâmetro, polímero que a reveste), do gás (temperatura) e dos próprios compostos a analisar. Compostos com mais afinidade para a fase estacionária da coluna são adsorvidos por ela e, portanto, retidos durante mais tempo. Isto resulta na saída (chamada eluição) das moléculas da coluna a tempos diferentes, chamados tempos de retenção.

No fim da coluna, o espectrómetro parte as moléculas em fragmentos ionizados, deteta-os e identifica-os [17].

O resultado de uma análise por GC-MS é um cromatograma, esquematizado como exemplo na Fig. 4.

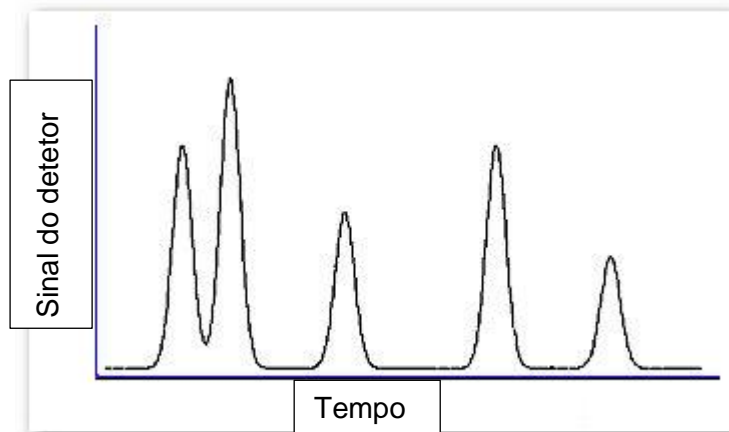


Fig. 4 - Esquema de um cromatograma

Há diversas variáveis no que respeita à espectrometria, que podem ser controladas pelo utilizador:

- ♦ O tipo de espectrómetro;
- ♦ O modo de ionização;
- ♦ Os iões detetados.

O espectrómetro pode ser quadrupolo (o mais usual), sector magnético ou armadilha de iões. A ionização pode ser feita por impacto de eletrões ou quimicamente, sendo o primeiro caso o mais frequente [18]. Quanto aos iões detetados, o *software* pode detetar todos os iões numa determinada gama de massas ou apenas os indicados previamente à análise. O primeiro caso é conhecido por “full scan detection” e o segundo por SIM (Selected Ion Monitoring – Monitorização de Ião Seleccionado) [19].

Um aparelho de GC-MS pode processar amostras em fase gasosa ou líquida, sendo que neste último caso a amostra será transferida para o cromatógrafo por uma microseringa. A amostra pode também ser parcial ou totalmente transferida para a coluna, ou seja, pode ser analisada, respetivamente, em modo *split* ou *splitless* [17].

A GC-MS é constituída por duas técnicas – cromatografia e espectrometria - que, noutros casos, podem ser usadas de forma independente. Para este fim

específico, no entanto, nenhuma delas por si só é suficiente. A cromatografia, sendo uma técnica de separação, não identifica compostos, e a espectrometria precisa da sua prévia separação para os identificar corretamente.

Algumas limitações da GC-MS são, por exemplo, a necessidade de passos prévios à cromatografia para uma melhor análise de compostos não voláteis [20].

Apesar de tudo, a técnica de GC-MS tem muitas aplicações, em campos tão diversos como a monitorização ambiental, ciências forenses, controlo de qualidade de alimentos e bebidas e medicina, entre outros [14, 21-23].

3. Objetivos do trabalho

O objetivo geral do presente trabalho é tentar perceber se existe uma correlação entre os compostos voláteis emitidos pelas plantas e a sua classificação taxonómica – por outras palavras, será que o perfil volátil de uma espécie pode ser usado como uma ferramenta auxiliar para a classificação taxonómica dessa espécie?

O segundo objetivo deste trabalho é determinar se a espécie em estudo, *Coincya johnstonii*, é um bom taxon, dado que só é admitida como espécie autónoma por autores ibéricos [6].

Para atingir esses objetivos, foram analisadas algumas espécies da família Brassicaceae. Foi estudada a espécie *Coincya johnstonii* como foco principal. *Raphanus raphanistrum* e *Hirschfeldia incana* foram também estudadas, para efeitos de comparação. As três espécies pertencem não só à mesma família como também à mesma tribo, Brassiceae [24].

Encontrar material de outras espécies do género *Coincya* revelou-se infrutífero, devido à época em que decorreu o estudo, pelo que não foi possível estudar mais nenhuma espécie deste género.

Coincya johnstonii foi escolhida como alvo primário de estudo por vários motivos, incluindo:

- ♦ Por ser nativa da Península Ibérica;
- ♦ Por poder tratar-se de um endemismo do Norte Litoral de Portugal;
- ♦ Por ter sido alvo de poucos estudos taxonómicos.

As plantas foram analisadas usando dois procedimentos químicos:

- ♦ SPME, um método de extração de compostos de amostras;
- ♦ GC-MS, um método de análise de compostos.

Foram escolhidos estes processos em particular por várias razões:

- ♦ Por, tanto quanto sabemos, nunca terem sido usados numa perspetiva taxonómica, no género aqui estudado;
- ♦ Por poderem ser levados a cabo nos laboratórios do Departamento de Química e Bioquímica da FCUP;
- ♦ Pela simplicidade e atualidade dos próprios métodos.

II. Parte Experimental

1. Instrumentação

1.1. Para SPME:

- ♦ Fibra com revestimento de PDMS (polidimetilsiloxano), com 100 µm de espessura;
- ♦ Fibra com revestimento de PDMS/ DVB (polidimetilsiloxano/divinilbenzeno), com 65 µm de espessura;
- ♦ Fibra com revestimento de CAR/ PDMS (carboxeno/polidimetilsiloxano), com 75 µm de espessura;
- ♦ Vial
- ♦ Banho termostaticado
- ♦ Copo termostaticado
- ♦ Suporte universal, garra e noz

Todas as fibras são de sílica fundida e são da Supelco (USA).

1.2. Para GC-MS:

- ♦ Equipamento Varian Saturn 2100T
- ♦ Injetor de tipo *split/splitless*

2. Procedimento experimental

2.1. Introdução

Para o presente trabalho foram obtidas duas plantas adultas pertencentes a cada uma das espécies em estudo: *Coincya johnstonii*, *Raphanus raphanistrum* e *Hirschfeldia incana*. Todas as plantas foram recolhidas em Maio de 2012. *Coincya johnstonii* foi recolhida na Praia da Memória, em Matosinhos, e as restantes em Silvalde, Espinho.

Não tendo nós conhecimento de qualquer outro trabalho em que as técnicas de SPME e GC-MS tenham sido aplicadas numa perspetiva de análise taxonómica neste género, tornou-se necessário efetuar testes prévios ao presente estudo para adaptar essas técnicas à questão específica aqui apresentada.

Em relação a SPME, começou-se por testar a extração dos compostos a tempos e temperaturas diferentes.

Fez-se a extração durante 30 minutos, e em seguida experimentou-se estendê-la até aos 50 minutos. Concluiu-se que o aumento desse tempo não alterava significativamente os resultados obtidos, o que levou à decisão de fixar daí em diante o tempo de extração em 30 minutos.

Testou-se igualmente a temperatura do banho-maria cuja água circularia no copo termostatzado em que seria colocado o vial com a amostra a analisar – a 30° e a 50°C. Por oposição ao que aconteceu com o tempo de extração, concluiu-se que o aumento da temperatura permitia detetar um número significativamente maior de compostos, o que era vantajoso para o estudo.

Em relação a GC-MS, começou-se também por analisar as amostras obtidas durante apenas 30 minutos, passando de seguida para 50 minutos. Verificou-se que o aumento do tempo de extração melhorava significativamente os resultados obtidos, o que levou à subsequente fixação em 50 minutos do tempo para todas as extrações seguintes.

2.2. SPME

Antes de ser usada, cada fibra foi condicionada no injetor de GC-MS, para garantir que não continha impurezas que pudessem contaminar a amostra. O condicionamento foi feito a 250°C durante 30 minutos.

Foram cortadas duas folhas da roseta basal de uma das plantas de *Coincya johnstonii*, as quais foram colocadas num vial que foi imediatamente colocado no copo termostaticado em que circulou água aquecida em banho-maria a 50°C. A fibra de SPME, já condicionada, foi inserida no vial e exposta ao *headspace* (o espaço acima da amostra) da amostra durante 30 minutos.

No fim desse tempo, a fibra foi retirada do vial e colocada no injetor do aparelho de GC-MS, para ser feita a análise dos compostos obtidos. Foi mantida lá por 5 minutos.

O procedimento foi o mesmo para as três fibras usadas neste trabalho.

Para cada análise foram usadas novas folhas cortadas de uma das plantas, escolhida aleatoriamente.

No caso de *Raphanus raphanistrum* e *Hirschfeldia incana*, devido ao maior tamanho das folhas, foi usada apenas uma folha por extração, em vez de duas.

2.3. GC-MS

Antes da análise dos compostos, o aparelho de GC-MS foi sujeito ao acondicionamento da coluna e ao condicionamento da fibra.

O acondicionamento da coluna foi feito durante 10 minutos a 250°C. O condicionamento da fibra foi feito também a 250°C, mas durante 30 minutos.

As amostras foram analisadas durante 50 min.

Para cada análise, o *software* traçou automaticamente um cromatograma. A biblioteca NIST (compilada pelo National Institute of Standards and Technology, que lhe dá o nome, e que contém milhares de espectros de massa para referência) compara cada pico presente no cromatograma com todos os espectros de massa inseridos na biblioteca e indica os compostos a que cada pico mais provavelmente corresponde. Para cada pico, foi escolhido, manualmente, a partir da lista de compostos prováveis, o composto que se pensa ser o correspondente ao pico.

Foi testada a existência de diferenças significativas entre filtros (fibras) e espécies em termos do número de substâncias encontradas, através de análise de variâncias (ANOVA), utilizando-se para esse efeito o *software* IBM SPSS Statistics 20 [25].

3. Resultados

3.1. Introdução

A análise de cada uma das espécies incluídas neste estudo produziu como resultados um conjunto de cromatogramas e uma lista de compostos químicos, cada um correspondendo a um pico de um dos cromatogramas.

Para cada espécie são apresentados quatro cromatogramas: um referente a cada uma das fibras usadas e um outro sobrepondo os três primeiros. Este último tem por objetivo facilitar a comparação visual.

Após a identificação dos compostos correspondentes aos picos de cada cromatograma, para cada espécie estudada, os resultados da análise pelas três fibras foram comprimidos numa única tabela. Isto porque cada fibra usada produziu um conjunto ligeiramente diferente de resultados. Isto era esperado, acontecendo devido à própria natureza das fibras. Como foi explicado na introdução deste trabalho, revestimentos de fibras diferentes têm maior afinidade para compostos diferentes.

Seguidamente apresentam-se os resultados referentes a cada uma das espécies estudadas.

3.2. Resultados relativos à espécie *Coincya johnstonii*

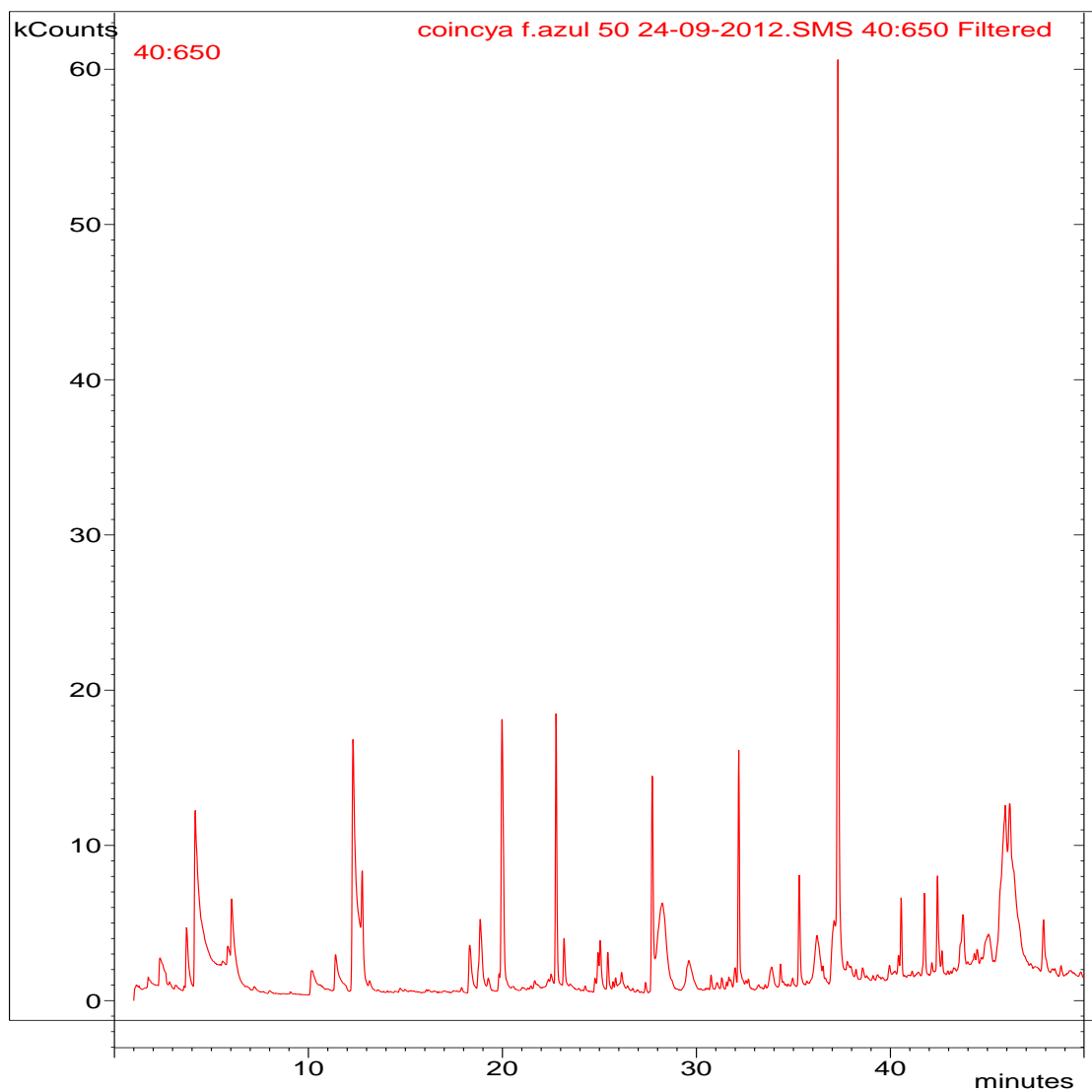


Fig. 5 - Cromatograma resultante da análise da espécie *Coincya johnstonii* com a fibra de PDMS/DVB a uma temperatura de 50°C

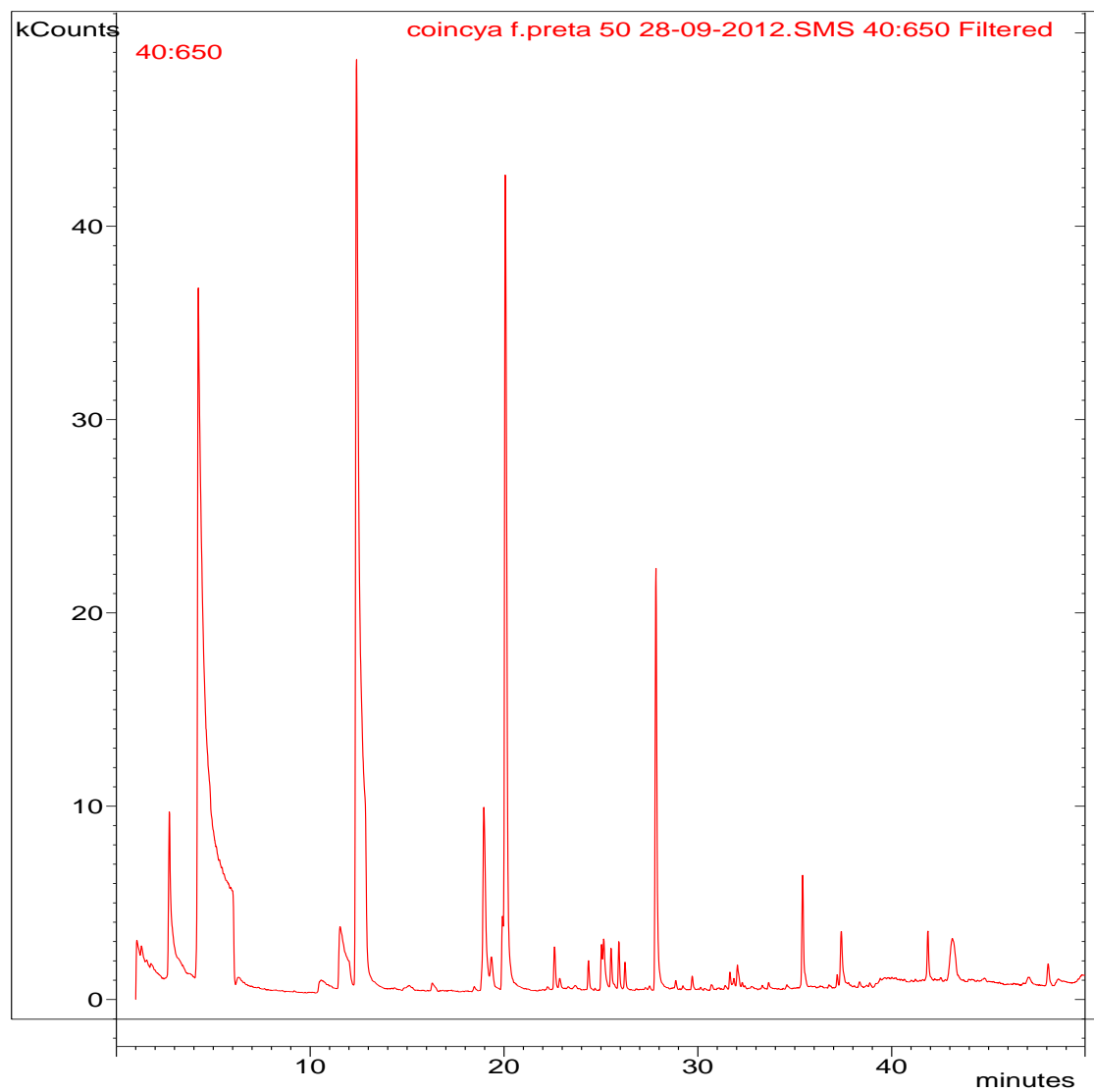


Fig. 6 - Cromatograma resultante da análise da espécie *Coincya johnstonii* com a fibra de CAR/PDMS a uma temperatura de 50°C

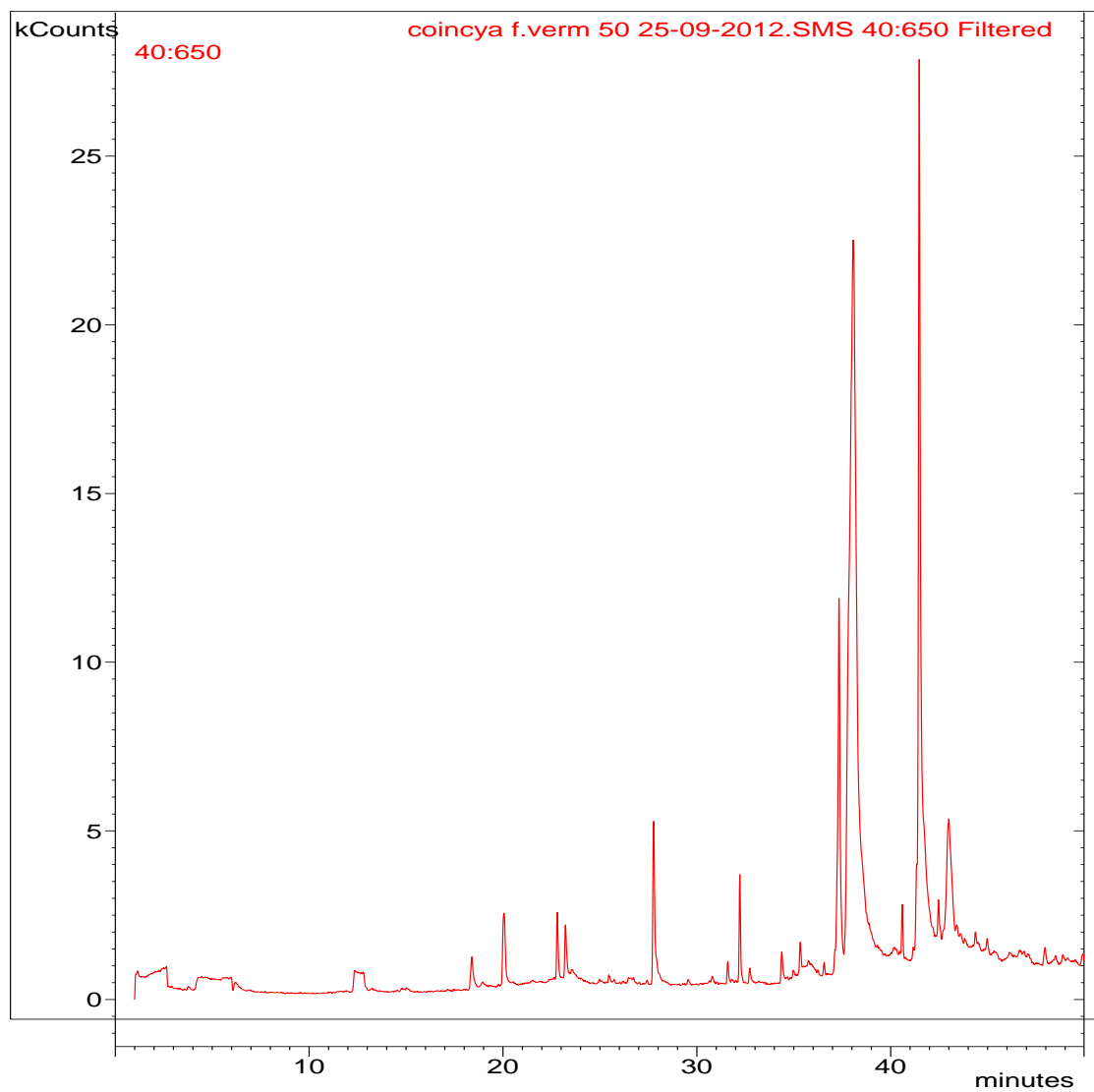


Fig. 7 - Cromatograma resultante da análise da espécie *Coincya johnstonii* com a fibra de PDMS a uma temperatura de 50°C

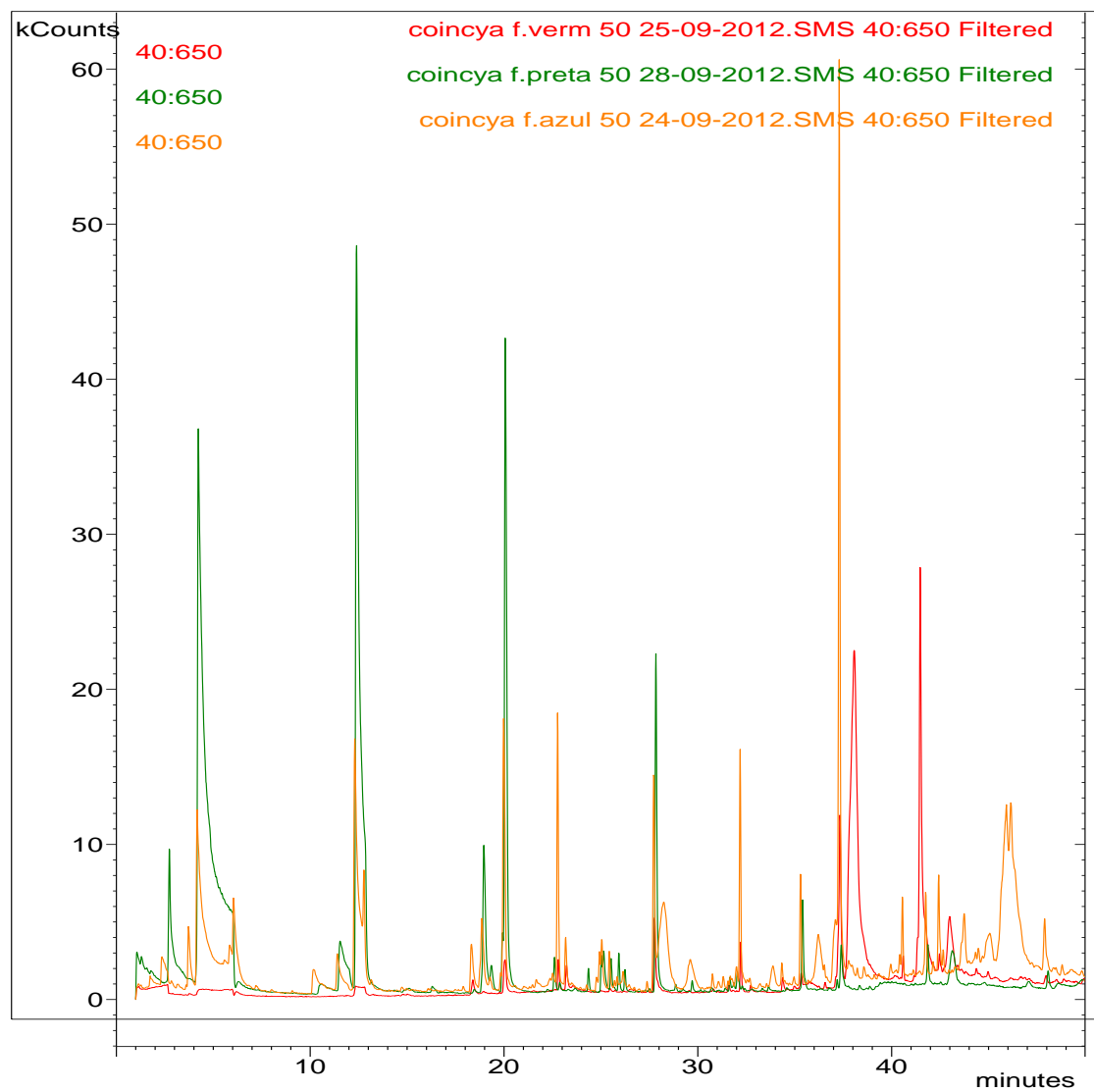


Fig. 8 - Sobreposição dos cromatogramas resultantes da análise da espécie *Coincya johnstonii* com as fibras de PDMS, CAR/PDMS e PDMS/DVB a uma temperatura de 50°C

Tabela 2 - Conjunto dos compostos encontrados nas análises à espécie *Coincya johnstonii*

| Categoria | Fórmula química | Nome do composto |
|----------------------------|-------------------|---|
| Alcanos | $C_5H_{10}Cl_2$ | 1,3-dicloro-3-metilbutano |
| | $C_{26}H_{54}$ | 3-etil-5-(2-etilbutil)-octodecano |
| Alcenos | $C_{12}H_{24}$ | 4-metil-1-undeceno |
| Álcoois | $C_6H_{12}O$ | (Z) 3-Hexen-1-ol |
| | $C_{12}H_{26}O$ | 2-butil-1-octanol |
| | $C_5H_{10}O$ | (Z) 2-Penten-1-ol |
| | $C_6H_{10}O$ | 2,4-Hexadien-1-ol |
| | $C_{17}H_{36}O$ | 2-metil-1-Hexadecanol |
| | $C_{10}H_{20}O$ | (E) 3-Decen-1-ol |
| | $C_{14}H_{30}O$ | 2-Hexil-1-octanol |
| | $C_{14}H_{28}O$ | E-7-Tetradecenol |
| | $C_{12}H_{26}O$ | 2-butil-1-octanol |
| | $C_{15}H_{26}O$ | (7 α -Isopropenil-4,5-dimetiloctahidroinden-4-il) metanol |
| | | |
| Cetonas | $C_{13}H_{10}O$ | Benzofenona |
| | $C_{14}H_{22}O$ | 1-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-1-penten-3-ona |
| | $C_{13}H_{22}O$ | 6,10-dimetil-(E)-5,9, undecadien-2-ona |
| | $C_{14}H_{22}O$ | α -Isometilionona |
| Ácidos Carboxílicos | $C_{20}H_{30}O_7$ | Ácido benzóico, 2-formil-4,6-dimetoxi-, 8,8-dimetoxioct-2-ilester |
| | $C_{12}H_{24}O_3$ | Ácido propanóico, 2-metil-, 3-hidroxi-2,4,4-trimetilpentilester |
| Ésteres | $C_{13}H_{24}O_2$ | 3,7-Dimetil-6-nonen-1-olacetato |
| Aminas | $C_{10}H_{23}NO$ | o-decil-hidroxilamina |
| | $C_{18}H_{39}N$ | N, N-dimetil-1-Hexadecanamina |
| Compostos fenólicos | $C_{26}H_{38}O_2$ | 4,4'-butilidenebis/2-(1,1-dimetiletil)-5-metil-fenol |
| | $C_{14}H_{22}O$ | 2,4-bis(1,1-dimetiletil)-fenol |
| | $C_{10}H_{14}O$ | 2-(1,1-dimetiletil)-fenol |

| | | |
|-----------------|--------------------|---|
| | $C_{10}H_{14}O$ | p-tert-butil-fenol |
| Aldeídos | $C_4H_8O_2$ | 3-hidroxibutanal |
| Outros | $C_8H_9NO_2$ | Oxime- metoxi-fenil- |
| | $C_{16}H_{15}NO_3$ | Isoquinolin-6,7-diol-, 3,4-dihydro-1-/ (4-hydroxyphenyl/methyl)- |
| | $C_{15}H_{15}N$ | 4-Methylbenzylidene-4-methyloniline |
| | $C_{16}H_{28}O$ | Ambrox |
| | $C_{17}H_{17}NO_3$ | 3,4-Dihydroisoquinolin-7-ol, 1-/4- hydroxybenzyl/-6-methoxy- |

Como é possível observar na tabela acima, para esta espécie foram identificados 32 compostos que, na sua maioria, podem ser categorizados em nove grupos químicos: 10 álcoois, 4 cetonas, 4 compostos fenólicos, 2 alcanos, 2 ácidos carboxílicos, 2 aminas, um alceno, um éster, um aldeído e 5 compostos que não pertencem a nenhuma das categorias anteriores.

3.3. Resultados relativos à espécie *Raphanus raphanistrum*

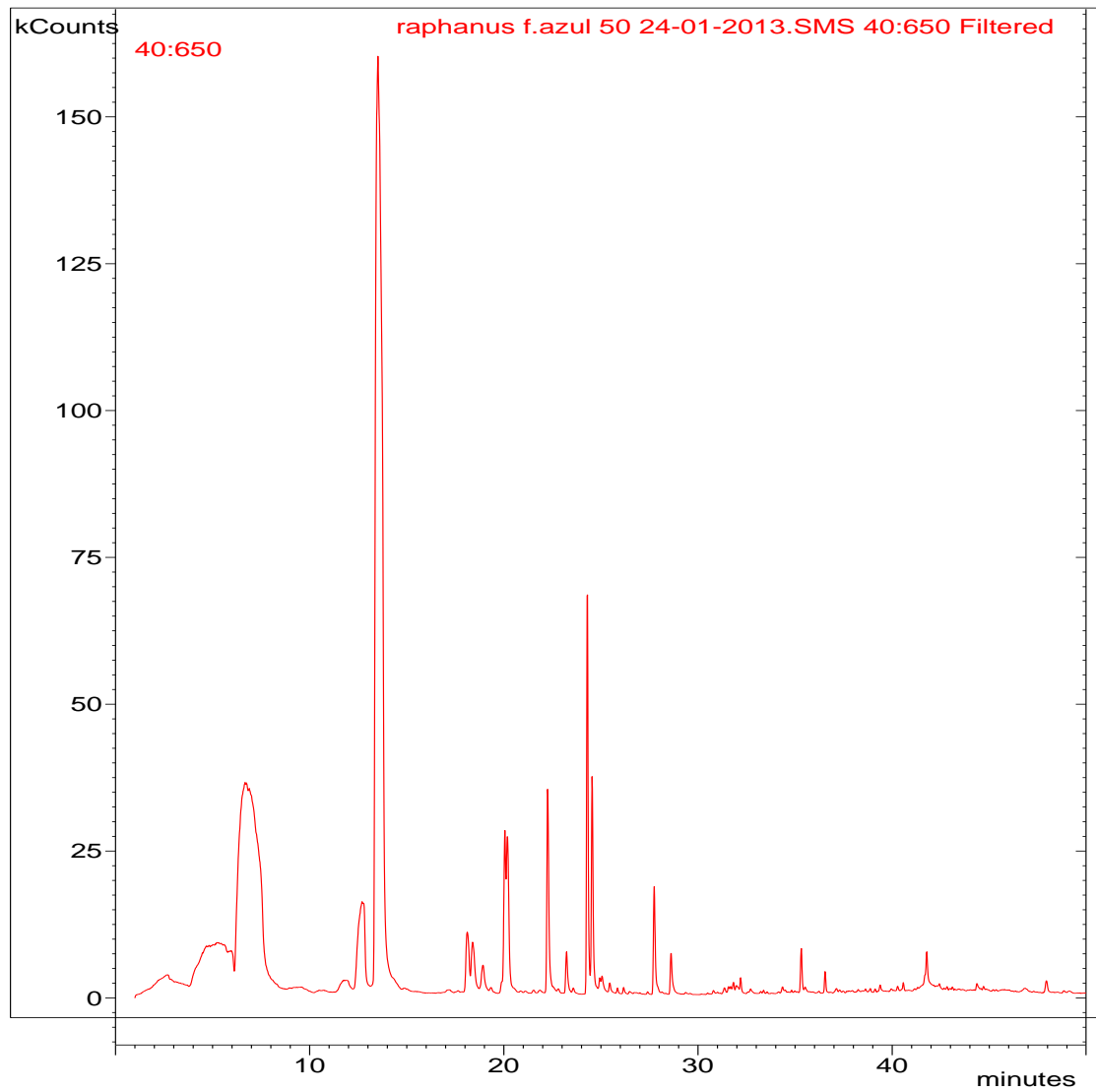


Fig. 9 - Cromatograma resultante da análise da espécie *Raphanus raphanistrum* com a fibra de PDMS/DVB a uma temperatura de 50°C

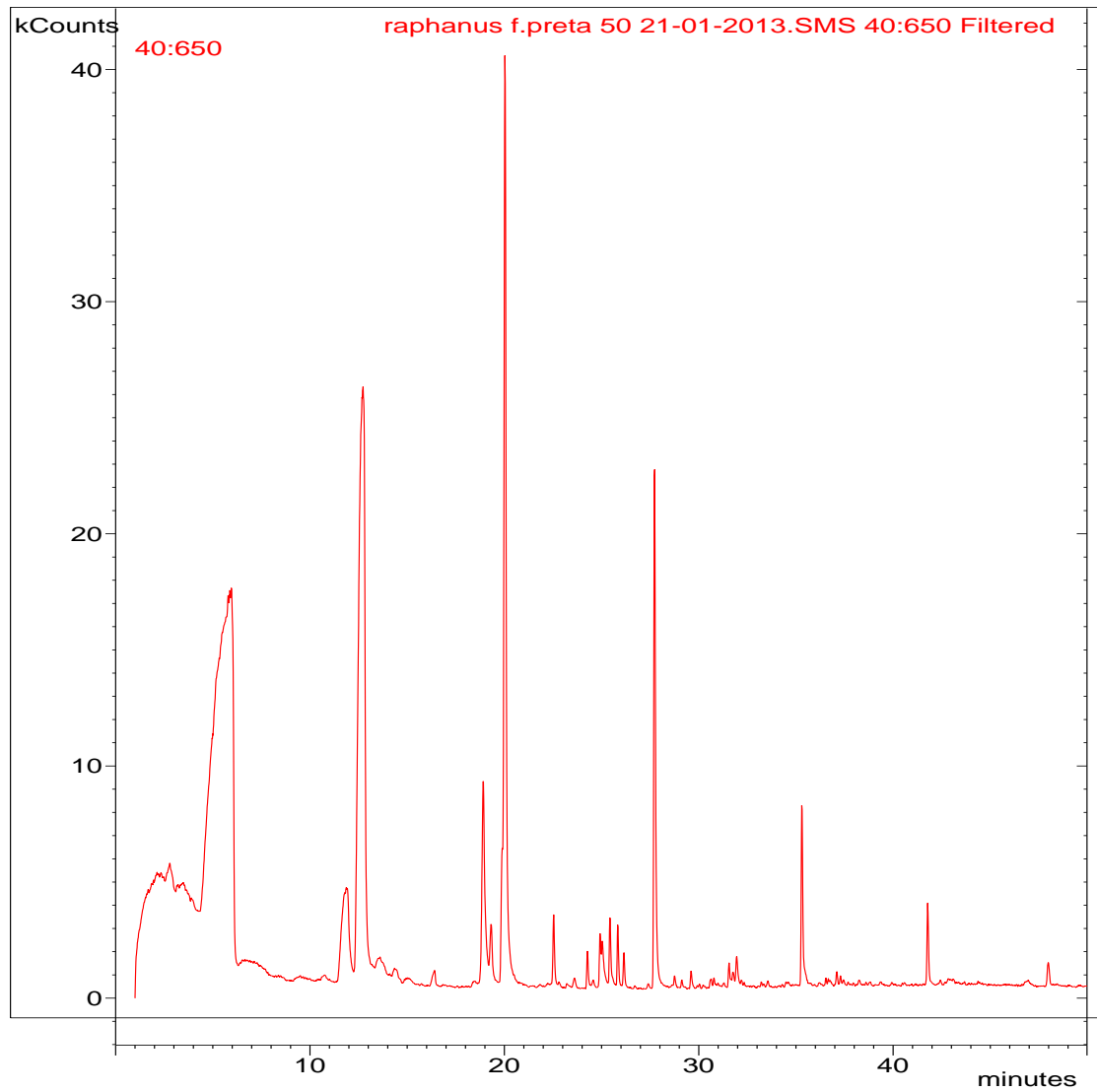


Fig. 10 - Cromatograma resultante da análise da espécie *Raphanus raphanistrum* com a fibra de CAR/ PDMS a uma temperatura de 50°C

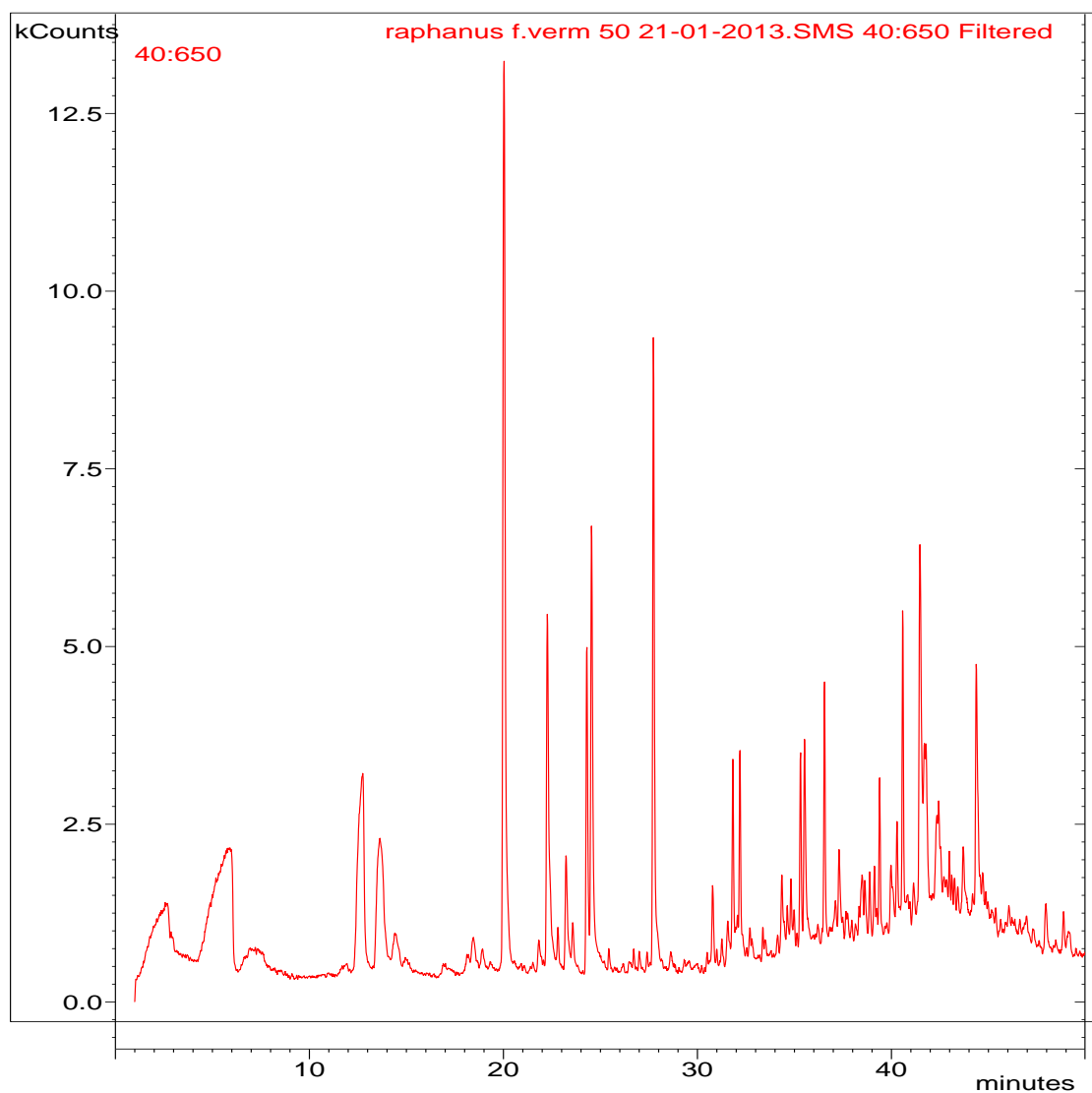


Fig. 11 - Cromatograma resultante da análise da espécie *Raphanus raphanistrum* com a fibra de PDMS a uma temperatura de 50°C

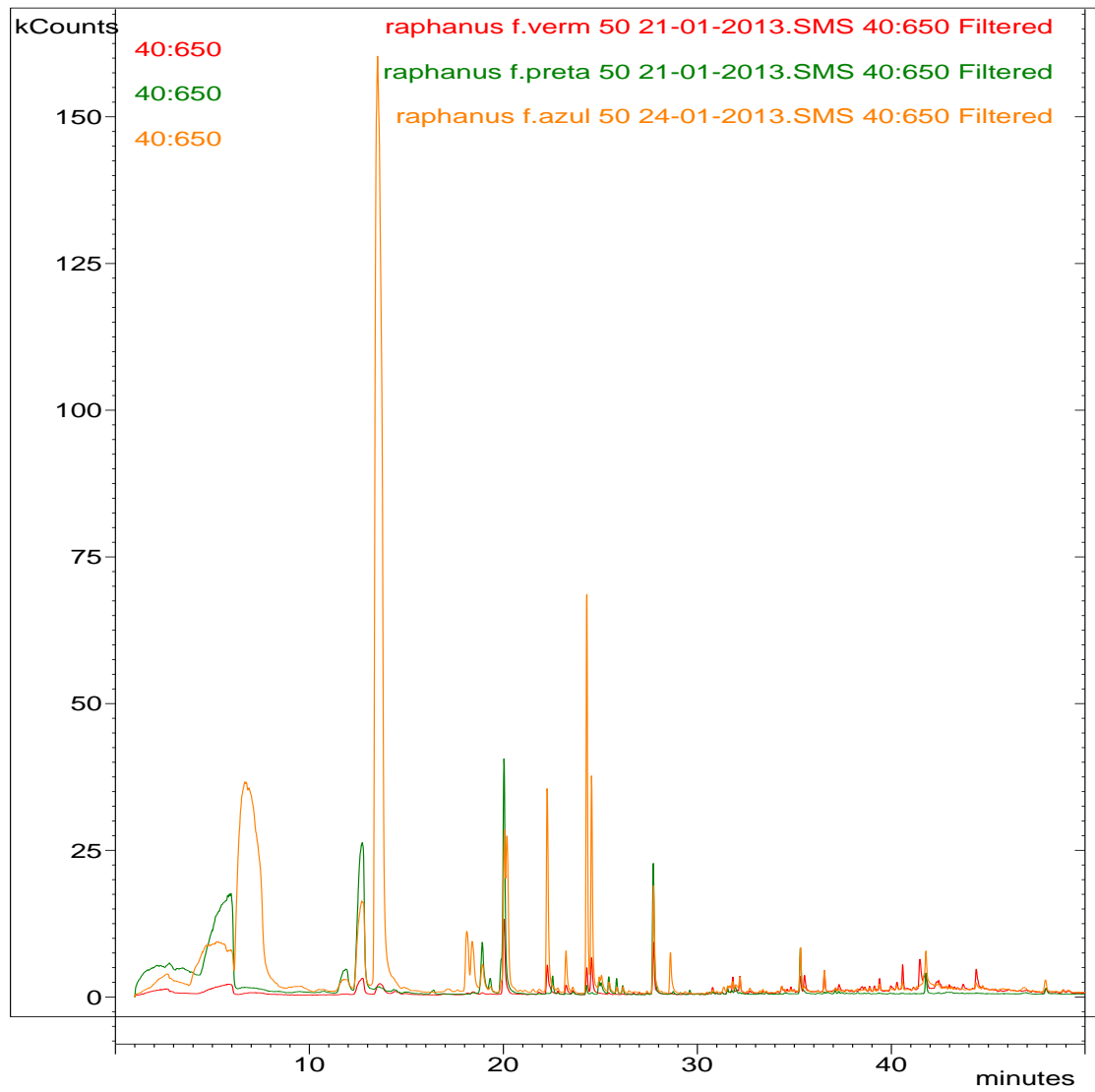


Fig. 12 - Sobreposição dos cromatogramas resultantes da análise da espécie *Raphanus raphanistrum* com as fibras de PDMS, CAR/PDMS e PDMS/DVB a uma temperatura de 50°C

Tabela 3 - Conjunto dos compostos encontrados nas análises à espécie *Raphanus raphanistrum*

| Categoria | Fórmula química | Nome do composto |
|----------------------------|----------------------|---|
| Alcanos | $C_{10}H_{18}$ | 1-isobutilidene-3-metil-ciclopentano |
| | $C_{20}H_{42}O$ | 1,1'-oxibis-decano |
| | $C_{17}H_{31}F_3O_2$ | 3-trifluoroacetoxipentadecano |
| Alcenos | $C_6H_{11}Br$ | 5-bromo-1-hexeno |
| | $C_{12}H_{24}$ | 4-metil-1-undeceno |
| Alcinos | $C_{10}H_{18}$ | 7-metil-1-nonino |
| | $C_{15}H_{28}$ | 1-pentadecino |
| Álcoois | $C_6H_{12}O$ | (Z)-3-hexen-1-ol |
| | $C_8H_{14}O_2$ | 4-hexen-1-ol, acetato |
| | $C_{10}H_{18}O$ | Eucaliptol |
| | $C_9H_{18}O$ | 2-nonen-1-ol |
| | $C_9H_{18}O$ | (6H)-Nonen-1-ol |
| | $C_6H_{12}O$ | 3-metil-ciclopentanol |
| | $C_{10}H_{20}O$ | (E)-3-decen-1-ol |
| | $C_9H_{16}O_2$ | (Z)-3-hexen-1-ol, propanoato |
| | $C_{13}H_{28}O$ | 1-tridecanol |
| | $C_{14}H_{30}O$ | 2-hexil-1-octanol |
| | $C_{16}H_{34}O$ | 2-hexyl-1-decanol |
| | $C_{15}H_{26}O$ | (7 α -isopropenil-4,5-dimetiloctahidroinden-4-il) metanol |
| Cetonas | $C_{13}H_{22}O$ | (E)- 6,10-dimetil-5,9-undecanien-2-ona |
| | $C_{13}H_{20}O$ | 4-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-3-buten-2-ona |
| | $C_{13}H_{10}O$ | Benzofenona |
| Ácidos carboxílicos | $C_{20}H_{30}O_7$ | Ácido benzóico, 2-formil-4,6-dimetoxi-, 8,8-dimetoxioct-2-ilester |
| | $C_9H_{16}O_2$ | Ácido propanóico, 4-hexen-1-ilester |
| | $C_{10}H_{18}O_2$ | (E)-Ácido butanóico, 3-hexenilester |
| | $C_{10}H_{18}O_2$ | Ácido butanóico, 4-hexen-1-ilester |
| | $C_{11}H_{20}O_2$ | Ácido pentanóico, 4-hexen-1-ilester |

| | | |
|----------------------------|-------------------------|---|
| | $C_5H_9ClO_2$ | Ácido cloroacético propiléster |
| Ésteres | $C_8H_{14}O_2$ | 4-hexen-1-ol, acetato |
| | $C_{11}H_{20}O_2$ | cis-3-hexenilisovalerato |
| Aminas | $C_{10}H_{23}NO$ | o-decil-hidroxilamina |
| Compostos fenólicos | $C_{26}H_{38}O_2$ | Phenol, 4,4'-butylidenbis/2-(1,1-dimethylethyl)-5-methyl- |
| | $C_{14}H_{22}O$ | 3,5-bis(1,1-dimetiletil)-fenol |
| Outros | $C_{44}H_{50}N_2O_{12}$ | α -lumicolchicina |
| | $C_{17}H_{17}NO_3$ | 1-/4-hidroxibenzil/-6-metoxi-3,4-dihidroisoquinolin-7-ol |

Para a espécie *Raphanus raphanistrum* foram encontrados 35 compostos, também quase todos categorizáveis em 9 grupos: 12 álcoois, 6 ácidos carboxílicos, 3 alcanos, 3 cetonas, 2 alkenos, 2 alcinos, 2 ésteres, 2 compostos fenólicos, uma amina e dois compostos que não pertencem a nenhuma das categorias anteriores.

3.4. Resultados relativos à espécie *Hirschfeldia incana*

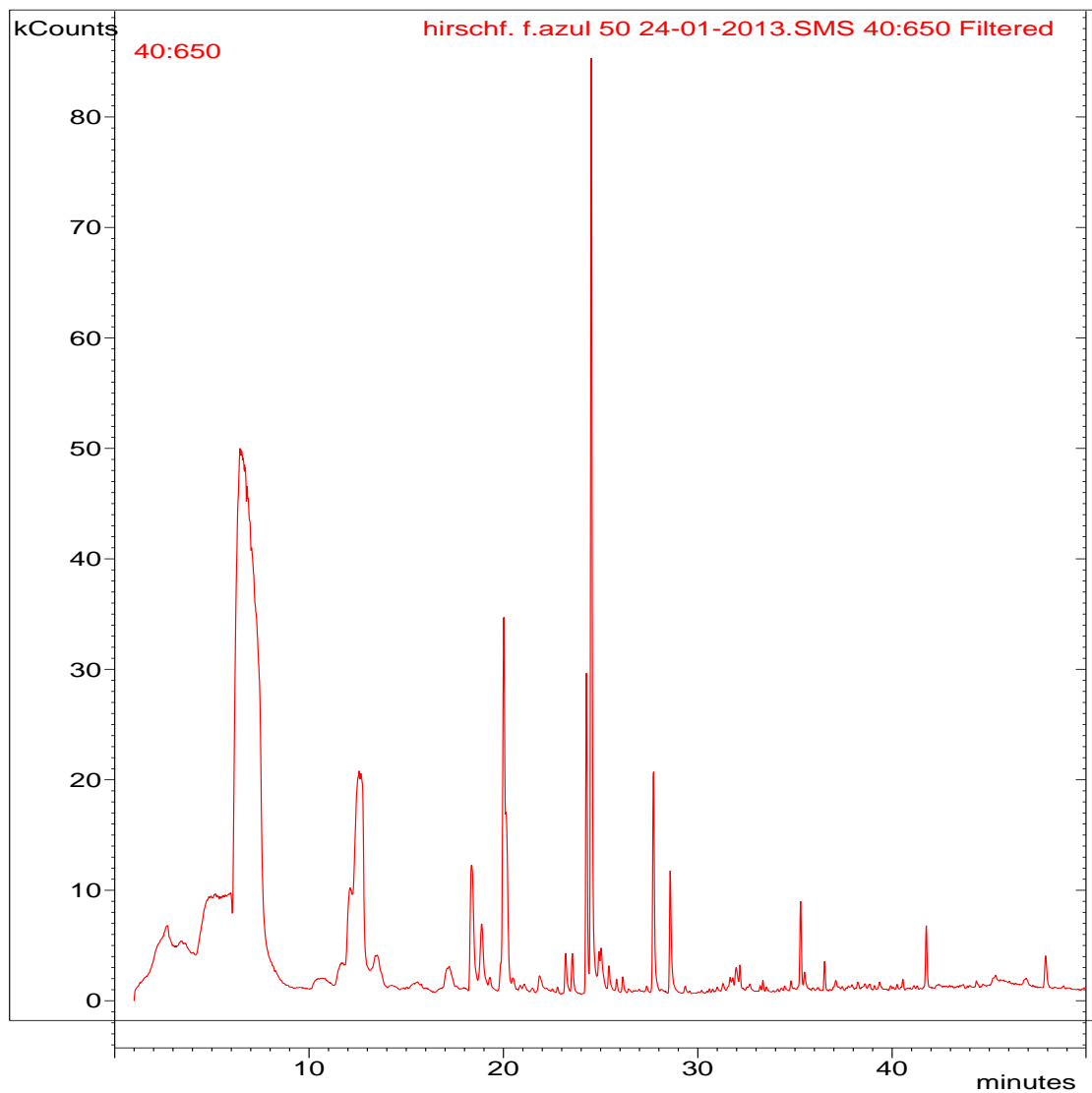


Fig. 13 - Cromatograma resultante da análise da espécie *Hirschfeldia incana* com a fibra de PDMS/DVB a uma temperatura de 50°C

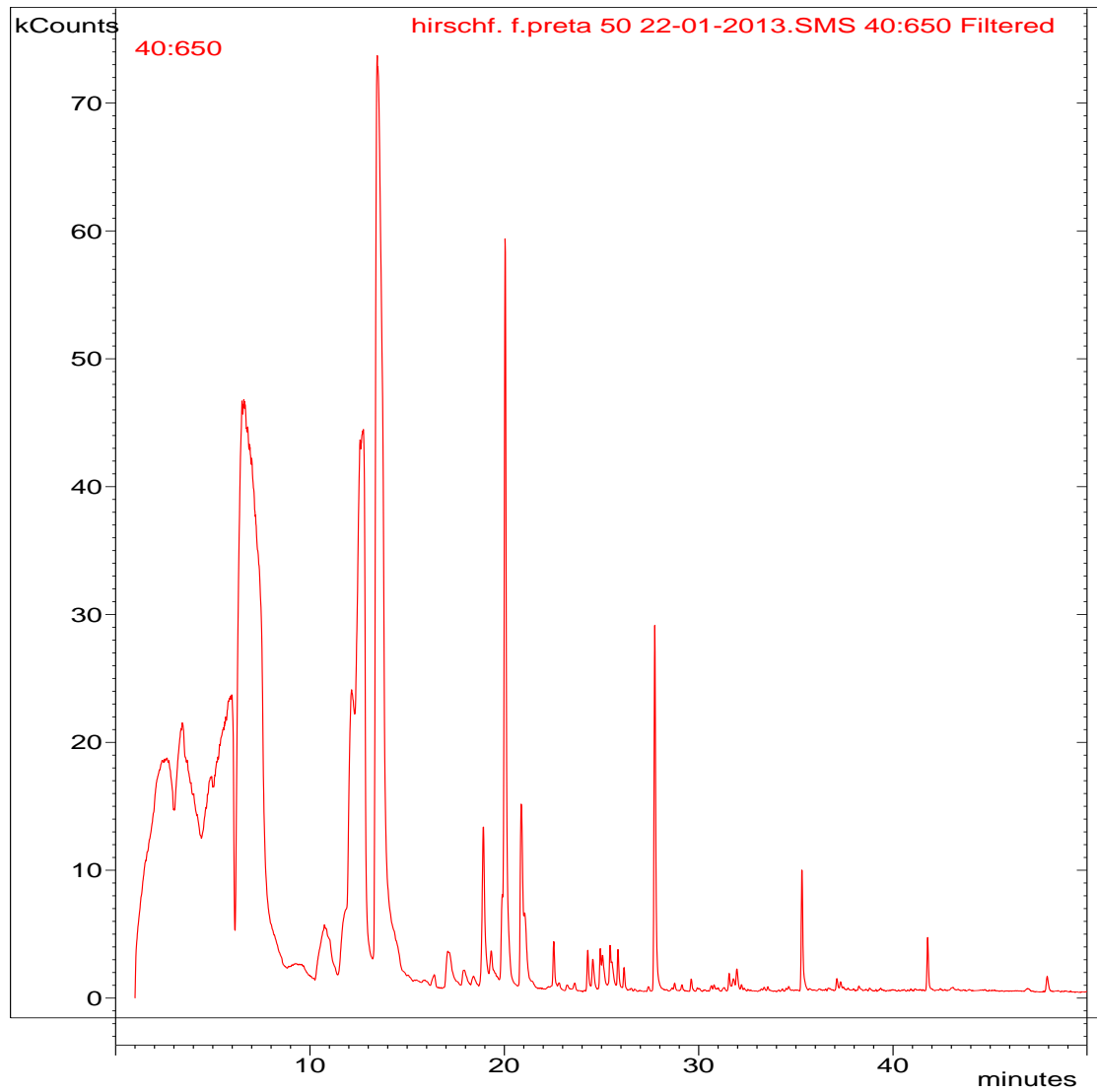


Fig. 14 - Cromatograma resultante da análise da espécie *Hirschfeldia incana* com a fibra de CAR/ PDMS a uma temperatura de 50°C

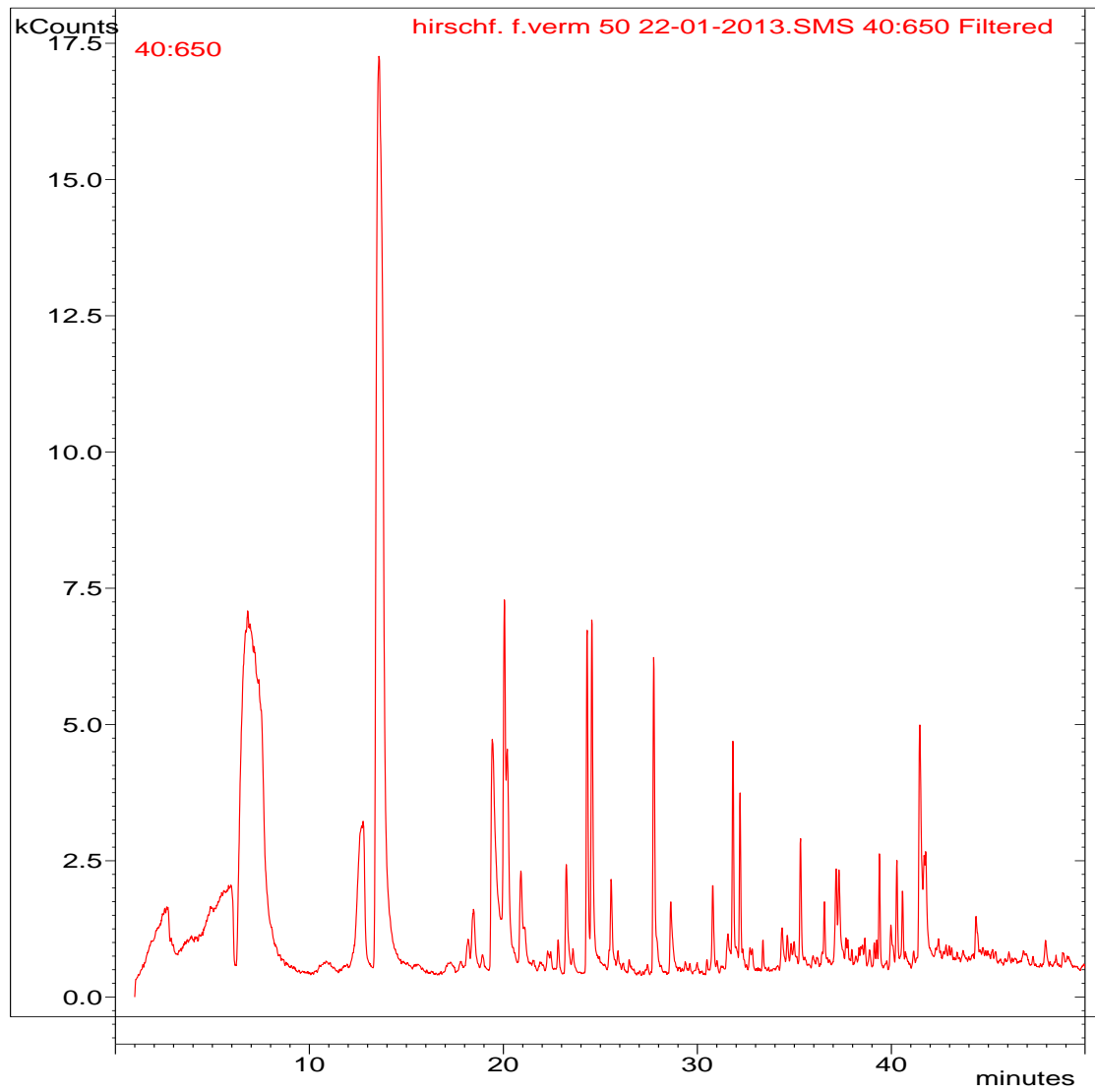


Fig. 15 - Cromatograma resultante da análise da espécie *Hirschfeldia incana* com a fibra de PDMS a uma temperatura de 50°C

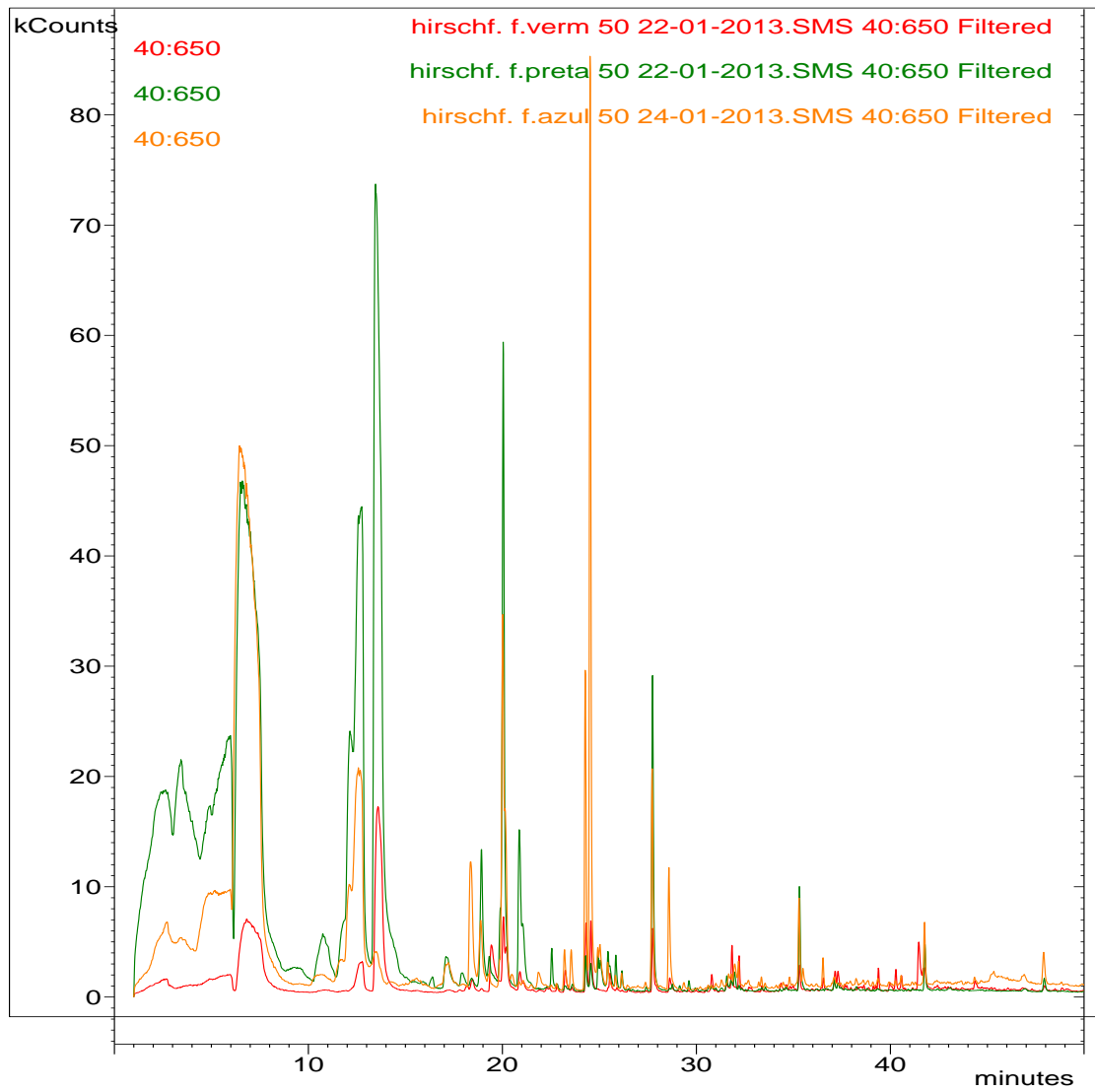


Fig. 16 - Sobreposição dos cromatogramas resultantes da análise da espécie *Hirschfeldia incana* com as fibras de PDMS, CAR/PDMS e PDMS/DVB a uma temperatura de 50°C

Tabela 4 - Conjunto dos compostos encontrados nas análises à espécie *Hirschfeldia incana*

| Categoria | Fórmula química | Nome do composto |
|---------------------|--------------------|--|
| Alcanos | $C_8H_{15}NS$ | 1-isotiocianato-heptano |
| | $C_{12}H_{24}Br_2$ | 1,2-dibromo-dodecano |
| Alcenos | $C_7H_{10}O$ | 3-metoxi-1,3,4-hexatrieno |
| | $C_6H_{11}Br$ | 5-bromo-1-hexeno |
| | C_5H_7NS | 4-isotiocianato-1-buteno |
| | $C_{10}H_{16}O$ | 2,6,6,-trimetil-1-ciclohexeno-1-carboxaldeído |
| | $C_{14}H_{28}$ | 7-tetradeceno |
| | $C_{20}H_{40}O$ | 1-(eteniloxi)-octadeceno |
| Álcoois | $C_6H_{12}O$ | 4-metil-2-penten-1-ol |
| | $C_6H_{12}O$ | (Z)-3-hexen-1-ol |
| | $C_9H_{18}O$ | 2-nonen-1-ol |
| | $C_6H_{12}O$ | (E)-4-hexen-1-ol |
| | $C_6H_{12}O$ | (Z)-4-hexen-1-ol |
| | $C_{10}H_{20}O$ | (E)-3-decen-1-ol |
| | $C_{14}H_{30}O$ | 2-hexil-1-octanol |
| | $C_{14}H_{30}O$ | 2-etil-1-dodecanol |
| | $C_{17}H_{36}O$ | 2-metil-1-hexadecanol |
| Cetonas | $C_{13}H_{22}O$ | (E)-6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona |
| | $C_{14}H_{20}O_2$ | 2,6-bis (1,1-dimetiletil)-2,5-ciclohexadiene-1,4-diona |
| | $C_{13}H_{10}O$ | Benzofenona |
| Ácidos carboxílicos | $C_{11}H_{12}O_4$ | (E)-2-ácido propenóico-3-(3,4-dimetoxifenil) |
| | $C_9H_{16}O_2$ | Ácido propanóico-4-hexen-1-ilester |
| | $C_{11}H_{20}O_2$ | Ácido pentanóico-4-hexen-1-ilester |
| | $C_6H_8O_4$ | 2,3-ácido dimetilfumárico |
| Ésteres | $C_8H_{14}O_2$ | 4-hexen-1-ol, acetato |
| | $C_7H_{13}NS$ | 4-metilpentilisotiocianato |
| Aminas | $C_{10}H_{23}NO$ | o-decil-hidroxilamina |

| | | |
|----------------------------|-------------------|---|
| Compostos fenólicos | $C_{26}H_{38}O_2$ | 4,4'-butilidenbis/2-(1,1-dimetiletil)-5-metil-fenol |
| | $C_{14}H_{22}O$ | 2,4-bis(1,1-dimetiletil)-fenol |
| Aldeídos | $C_5H_{10}O$ | Pentanal |
| Outros | $C_8H_9NO_2$ | Oxime-, metoxy-fenil_ |
| | C_5H_7NS | 4,5-dimetil-tiazole |

Foram encontrados nas análises à espécie *Hirschfeldia incana* 32 compostos, divididos na sua maioria em 9 categorias: 9 álcoois, 6 alcenos, 4 ácidos carboxílicos, 3 cetonas, 2 alcanos, 2 ésteres, 2 compostos fenólicos, uma amina, um aldeído e dois compostos não pertencentes a nenhuma das categorias anteriores.

3.5. Discussão

Tanto quanto é do nosso conhecimento, este tipo de técnicas, com intuitos taxonómicos, nunca foi utilizado em estudos do género *Coincya* e, mesmo em Brassicaceae, são muito escassos os trabalhos já realizados à exceção de alguns géneros como *Cleome* [26].

Dada a falta de protocolos desenvolvidos para este tipo de análises adaptados às espécies estudadas, foi necessário desenvolvê-los, o que exigiu um profundo trabalho laboratorial e, por outro lado, consumiu tempo que poderia ter sido utilizado no desenvolvimento de outros procedimentos, nomeadamente na quantificação dos compostos, no estudo comparativo de outros taxa ou até na aplicação de técnicas complementares e/ou de análise, nomeadamente na repetição das técnicas de modo a obter dados suficientes para se poder proceder a análises uni- ou multivariadas dos dados.

A partir da literatura, infere-se que a informação sobre o género *Coincya*, sobretudo no que respeita a estudos comparativos, não só é escassa como limitada. Estudos comparativos de anatomia, fisiologia ou bioquímica seriam úteis para perceber e fortalecer o conhecimento sobre as relações das espécies de *Coincya*. O presente trabalho pretendia inicialmente comparar as espécies de *Coincya* mais relacionadas, mas tal não foi possível devido a fatores vários referentes não só à climatologia/meteorologia do ano em curso (alteração da época de floração, por exemplo), como ao facto de não se ter conseguido encontrar e conservar as restantes espécies autóctones do género.

A tabela seguinte (Tabela 5) sumariza os compostos encontrados no total das três espécies, e indica em qual, ou quais, foi encontrado cada composto específico.

Um total de 77 compostos diferentes foram encontrados para os taxa estudados.

Tabela 5 - Lista de compostos encontrados nas três espécies estudadas

| Nome do Composto | | <i>Coincya</i> | <i>Raphanus</i> | <i>Hirschfeldia</i> |
|------------------|---|----------------|-----------------|---------------------|
| Alcanos | 1,3-dicloro-3-metilbutano | X | | |
| | 3-etil-5-(2-etilbutil)-octodecano | X | | |
| | 1-isobutilidene-3-metil-ciclopentano | | X | |
| | 1,1'-oxibis-decano | | X | |
| | 3-trifluoroacetoxipentadecano | | X | |
| | 1-isotiocianato-heptano | | | X |
| | 1,2-dibromo-dodecano | | | X |
| Alcenos | 3-metoxi-1,3,4-hexatrieno | | | X |
| | 5-bromo-1-hexeno | | X | X |
| | 4-isotiocianato-1-buteno | | | X |
| | 2,6,6,-trimetil-1-ciclohexeno-1-carboxaldeido | | | X |
| | 7-tetradeceno | | | X |
| | 1-(eteniloxi)-octadeceno | | | X |
| | 4-metil-1-undeceno | X | X | |
| Alcinos | 7-metil-1-nonino | | X | |
| | 1-pentadecino | | X | |
| Álcoois | (Z), 3-Hexen-1-ol | X | X | X |
| | 2-butil-1-octanol | X | | |
| | (Z) 2-Penten-1-ol | X | | |
| | 2,4-Hexadien-1-ol | X | | |
| | 2-metil-1-Hexadecanol | X | | |
| | (E) 3-Decen-1-ol | X | X | X |
| | 2-Hexil-1-octanol | X | X | X |
| | E-7-Tetradecenol | X | | |
| | 2-butil-1-octanol | X | | |
| | (7 α -Isopropenil-4,5-dimetiloctahidroinden-4-il)metanol | X | X | |
| | 4-hexen-1-ol, acetato | | X | |
| | Eucaliptol | | X | |
| | 2-nonen-1-ol | | X | X |
| | (6H)-Nonen-1-ol | | X | |
| | 3-metil-ciclopentanol | | X | |
| | (Z)-3-hexen-1-ol, propanoato | | X | |
| | 1-tridecanol | | X | |
| | 2-hexyl-1-decanol | | X | |
| | 4-metil-2-penten-1-ol | | | X |

Tabela 5 - Lista de compostos encontrados nas três espécies (cont.)

| Nome do Composto | | <i>Coincya</i> | <i>Raphanus</i> | <i>Hirschfeldia</i> |
|--------------------------------|---|----------------|-----------------|---------------------|
| Álcoois (cont.) | (E)-4-hexen-1-ol | | | X |
| | (Z)-4-hexen-1-ol | | | X |
| | 2-etil-1-dodecanol | | | X |
| | 2-metil-1-hexadecanol | | | X |
| Cetonas | (E)-6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona | X | X | X |
| | 2,6-bis (1,1-dimetiletil)-2,5-ciclohexadiene-1,4-diona | | | X |
| | Benzofenona | X | X | X |
| | 4-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)- 3-buten-2-ona | | X | |
| | 1-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-1-penten-3-ona | X | | |
| | α-Isometilionona | X | | |
| Ácidos carboxílicos | Ácido benzóico, 2-formil-4,6-dimetoxi-, 8,8-dimetoxioct-2-ilester | X | X | |
| | Ácido propanóico, 2-metil-, 3-hidroxi-2,4,4-trimetilpentilester | X | | |
| | Ácido propanóico, 4-hexen-1-ilester | | X | X |
| | (E)-Ácido butanóico, 3-hexenilester | | X | |
| | Ácido butanóico, 4-hexen-1-ilester | | X | |
| | Ácido pentanóico, 4-hexen-1-ilester | | X | X |
| | Ácido cloroacético propiléster | | X | |
| | (E)-2-ácido propenóico-3-(3,4-dimetoxifenil) | | | X |
| | 2,3-ácido dimetilfumárico | | | X |
| Ésteres | 4-hexen-1-ol, acetato | | X | X |
| | 4-metilpentilisotiocianato | | | X |
| | cis-3-hexenilisovalerato | | X | |
| | 3,7-Dimetil-6-nonen-1-olacetato | X | | |
| Aminas | o-decil-hidroxilamina | X | X | X |
| | N, N-dimetil-1-Hexadecanamina | X | | |
| Compostos fenólicos | 4,4'-butilidenbis/2-(1,1-dimetiletil)-5-metil-fenol | X | | X |
| | 2,4-bis(1,1-dimetiletil)-fenol | X | | X |
| | Phenol, 4,4'-butylidenbis/2-(1,1-dimethylethyl)-5-methyl- | | X | |
| | 3,5-bis(1,1-dimetiletil)-fenol | | X | |
| | 2-(1,1-dimetiletil)-fenol | X | | |
| | p-tert-butil-fenol | X | | |

Tabela 5 - Lista de compostos encontrados nas três espécies (cont.)

| Nome do Composto | | <i>Coincya</i> | <i>Raphanus</i> | <i>Hirschfeldia</i> |
|------------------|--|----------------|-----------------|---------------------|
| Aldeídos | 3-hidroxibutanal | X | | |
| | Pentanal | | | X |
| Outros compostos | Oxime-, metoxy-fenil_ | X | | X |
| | 4,5-dimetil-tiazole | | | X |
| | α-lumicolchicina | | X | |
| | 1-/4-hidroxibenzil/-6-metoxi-3,4-dihidroisoquinolin-7-ol | | X | |
| | Isoquinolin-6,7-diol-, 3,4-dihydro-1-/ (4-hydroxyphenyl/methyl)- | X | | |
| | 4-Methylbenzylidene-4-methyloniline | X | | |
| | Ambrox | X | | |
| | 3,4-Dihidroisoquinolin-7-ol, 1-/4-hydroxybenzyl/-6-methoxy- | X | | |

Acerca do conjunto total de resultados, as observações mais gerais e imediatas são o número de compostos observados, que é muito semelhante nas três espécies estudadas, e a categoria com mais compostos observados, que é sempre a dos álcoois.

Para cada espécie foram encontrados alcanos diferentes. *Raphanus raphanistrum* é a única espécie na qual foram encontrados alcinos, e também a única na qual não foram encontrados aldeídos. Em *Coincya johnstonii* foi encontrado o maior número de compostos que não se encaixam numa categoria específica.

Os resultados deste estudo indicam para *Coincya johnstonii* 20 compostos específicos: dois alcanos, seis álcoois, duas cetonas, um ácido carboxílico, um éster, uma amina, dois compostos fenólicos, um aldeído e quatro compostos sem categoria. Este número representa 62,5% do número de compostos observado nesta espécie. *Raphanus raphanistrum* possui 21 compostos específicos, enquanto *Hirschfeldia incana* tem apenas 18.

Em relação a compostos partilhados, verifica-se que há bastantes comuns a várias das espécies. Foram encontrados 17 compostos em comum a pelo menos duas das espécies, sendo que 6 deles são comuns a todas. Isto significa que cada uma das três espécies estudadas partilha quase $\frac{1}{4}$ dos seus compostos com as outras duas espécies.

Estes resultados são apresentados com mais detalhe na tabela seguinte:

Tabela 6 - Lista de compostos encontrados em mais do que uma espécie

| Comum a... | Fórmula química | Nome do composto |
|---------------------------------------|-------------------|---|
| Todas | $C_6H_{12}O$ | (Z)-3-Hexen-1-ol |
| | $C_{13}H_{10}O$ | Benzofenona |
| | $C_{10}H_{23}NO$ | o-decil-hidroxilamina |
| | $C_{10}H_{20}O$ | (E)-3-decen-1-ol |
| | $C_{14}H_{30}O$ | 2-hexil-1-octanol |
| | $C_{13}H_{22}O$ | (E)- 6,10-dimetil-5,9-undecanien-2-ona |
| <i>Coincya e Raphanus</i> | $C_{20}H_{30}O_7$ | Ácido benzoico, 2-formil-4,6-dimetoxi-, 8,8-dimetoxioct-2-ilester |
| | $C_{12}H_{24}$ | 4-metil-1-undeceno |
| | $C_{15}H_{26}O$ | (7 α -isopropenil-4,5-dimetiloctahidroinden-4-il) metanol |
| <i>Coincya e Hirschfeldia</i> | $C_8H_9NO_2$ | Oxime-, metoxi-fenil_ |
| | $C_{14}H_{22}O$ | 2,4-bis(1,1-dimetiletil)-fenol |
| | $C_{26}H_{38}O_2$ | 4,4'-butilidenebis/2-(1,1-dimetiletil)-5-methyl-fenol |
| <i>Raphanus e Hirschfeldia</i> | $C_8H_{14}O_2$ | 4-hexen-1-ol, acetato |
| | $C_{11}H_{20}O_2$ | Ácido pentanóico, 4-hexen-1-ilester |
| | $C_9H_{16}O_2$ | Ácido propanóico, 4-hexen-1-ilester |
| | $C_9H_{18}O$ | 2-nonen-1-ol |
| | $C_6H_{11}Br$ | 5-bromo-1-hexeno |

Conclusão

No geral, os resultados obtidos neste trabalho devem ser considerados bastante promissores. As técnicas usadas parecem adequar-se à questão em estudo. Não se verificaram problemas na extração nem na identificação dos compostos voláteis presentes nas três espécies, após terem sido adequados os protocolos de extração e análise. Como não são conhecidos outros trabalhos ou estudos semelhantes para o género, considera-se que antes de retirar conclusões definitivas, será prudente e necessário realizar um maior número de análises.

O número de compostos detetados foi muito semelhante nas três espécies estudadas, tal como o número de compostos partilhados entre pares de espécies e entre as três (aproximadamente $\frac{1}{4}$ dos compostos encontrados). Isto é congruente com o facto de as três espécies serem filogeneticamente bastante próximas. No entanto, mais dados são necessários para concluir quais as duas espécies mais próximas entre si, entre as estudadas.

Revela-se também essencial a recolha de mais dados para demonstrar claramente se *Coincya johnstonii* é ou não uma entidade independente, e sobretudo a sua comparação a nível interespecífico. O facto de mais de metade dos compostos encontrados nesta espécie não serem partilhados com nenhuma das outras estudadas parece apontar para uma resposta afirmativa, mas mais espécies do género *Coincya* (idealmente todas) deverão ser submetidas a estudos semelhantes ao presente e os resultados comparados antes de se poder chegar a uma conclusão definitiva.

Ainda que se possa dizer que existem diferenças significativas entre filtros (fibra usada) no que respeita ao número de substâncias, com um *p-value* de 0,053, não foram encontradas diferenças com significância estatística entre espécies no número de substâncias detetadas. Para explorar melhor o efeito de cada filtro vs. espécie, seria necessário ter realizado um maior número de observações.

Por outro lado, por falta de tempo, não foi possível proceder a uma análise quantitativa dos compostos encontrados o que poderia, eventualmente, tal como

acontece para outros géneros e grupos vegetais, mostrar diferenças significativas entre os taxa [27, 28]

Como conclusão, considera-se que este trabalho representa um contributo válido para o estudo em causa. Como já foi referido, *Coincya johnstonii* parece possuir uma identidade própria que a diferencia e autonomiza em relação às demais espécies do mesmo género. A verificar-se esta autonomia, estaremos perante uma porta que se abre, iniciando um caminho que poderá conduzir a uma taxonomia muito ambicionada e deveras pretendida pelo significado que representa.

Simultaneamente, foi desenvolvido um protocolo de trabalho que facilmente poderá ser agora adaptado para aplicação não só aos taxa específicos do género *Coincya* mas, também, a outros géneros e espécies.

De salientar que toda esta investigação resultou de um processo de colaboração entre o Departamento de Biologia e o Departamento de Química, particularmente do laboratório do grupo QuAQuA da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, representando uma parceria que abre portas a futuras colaborações das quais poderão resultar trabalhos inéditos e inovadores.

Propostas de Trabalho Futuro

Considera-se que seria de grande interesse continuar este trabalho no futuro. Sugere-se, numa primeira fase, continuar com o género *Coincya* e estudar outras espécies, subespécies e variedades pertencentes a este género. A fase seguinte seria alargar o estudo a outros géneros da família Brassicaceae e, idealmente, continuar de seguida para outras famílias.

Um aspeto muito importante a ter em conta em análises futuras é o número de observações feitas. Como foi verificado com o presente trabalho, tal número deverá ser aumentado, para que se possam retirar do estudo conclusões com significância estatística.

Estudos posteriores podem ser também realizados, com outros objetivos. Por exemplo, o foco pode ser num composto específico, ou conjunto de compostos, que podem ser analisados em detalhe com o objetivo de se descobrirem potenciais usos importantes para o Homem.

O estudo de VOCs (Compostos Orgânicos Voláteis) é uma linha de trabalho interessante a seguir, uma vez que eles parecem desempenhar um papel central nas interações planta-ambiente, afetando processos chave como reprodução, defesa, comunicação, etc., particularmente os terpenos que são um grupo importante, podendo funcionar como toxinas, repelentes ou na atração de outros organismos, nomeadamente polinizadores. Dadas as diferenças de habitat entre as espécies do género *Coincya*, todas de montanha à exceção de *C. johnstonii*, poderia produzir resultados de grande interesse não só a nível taxonómico mas também ecológico [29].

Referências Bibliográficas

1. Franzke, A., et al., *Cabbage family affairs: the evolutionary history of Brassicaceae*. Trends in plant science, 2011. **16**(2): p. 108-116.
2. La Rovere, E.L., A.S. Pereira, and A.F. Simões, *Biofuels and Sustainable Energy Development in Brazil*. World Development, 2011. **39**(6): p. 1026-1036.
3. Krishnaswamy, N.R. and C.N. Sundaresan, *Fascinating organic molecules from nature*. Resonance, 2012. **17**(11): p. 1022-1033.
4. Fay, M.F. and M.J.M. Christenhusz, *BRASSICALES – AN ORDER OF PLANTS CHARACTERISED BY SHARED CHEMISTRY*. Curtis's Botanical Magazine, 2010. **27**(3): p. 165-196.
5. Stevens, P. F. (2001 onwards). Angiosperm Phylogeny Website. Version 12, July 2012 <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
6. Sampaio, G. 1906. Notas críticas sobre a flora portuguesa. Ann. Sci. Nat. (Porto), 10: 5-78.
7. Heywood, V.H. 1963. Notulae Systematicae ad Floram Europaeam spectantes. Feddes Repert. Spec. Nov. Regni Veg. 68 (3): 196.
8. Greuter, W. & Raus, Th. (Eds.) 1983. Med-Checklist Notulae, 7. Willdenowia 13: 79–99
9. Leadlay, E.A. and V.H. Heywood, *The biology and systematics of the genus Coincya Porta & Rigo ex Rouy (Cruciferae)*. Botanical Journal of the Linnean Society, 1990. **102**(4): p. 313-398.
10. Castroviejo et. al. (Eds.) 1993. Flora Iberica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Vol. 4 (Cruciferae). C.S.I.C. Madrid
11. Honrado, J. (Coord.) 2007. PAISAGEM PROTEGIDA DO LITORAL DE VILA DO CONDE - PROPOSTA DE CRIAÇÃO. CIBIO. Porto

12. de Fátima Alpendurada, M., *Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis*. Journal of Chromatography A, 2000. **889**(1–2): p. 3-14.
13. Kataoka, H., H.L. Lord, and J. Pawliszyn, *Applications of solid-phase microextraction in food analysis*. Journal of Chromatography A, 2000. **880**(1–2): p. 35-62.
14. González-Mas, M.C., et al., *Comparative analysis of the volatile fraction of fruit juice from different citrus species*. PloS one, 2011. **6**(7): p. e22016.
15. Riu-Aumatell, M., et al., *Characterisation of volatile composition of white salsify (Tragopogon porrifolius L.) by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and simultaneous distillation–extraction (SDE) coupled to GC–MS*. Food Chemistry, 2011. **129**(2): p. 557-564.
16. Jirovetz, L., D. Smith, and G. Buchbauer, *Aroma Compound Analysis of Eruca sativa (Brassicaceae) SPME Headspace Leaf Samples Using GC, GC–MS, and Olfactometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(16): p. 4643-4646.
17. Holler, F. J.; Skoog, D. A.; Crouch, S. R.. 2009. *Princípios de análise instrumental*. Bookman, 2009. 6ª edição. Tradução de Célio Pasquini do original *Principles of instrumental analysis*. Ed. orig. 2007
18. Fernandes, V.C., et al., *Determination of Pesticides in Fruit and Fruit Juices by Chromatographic Methods. An Overview*. Journal of Chromatographic Science, 2011. **49**(9): p. 715-730.
19. Ragunathan, N., et al., *Gas chromatography with spectroscopic detectors*. Journal of Chromatography A, 1999. **856**(1–2): p. 349-397.
20. McDonald, J., S. Matthew, and R. Auchus, *Steroid Profiling by Gas Chromatography–Mass Spectrometry and High Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry for Adrenal Diseases*. Hormones and Cancer, 2011. **2**(6): p. 324-332.
21. Forsberg, N.D., G.R. Wilson, and K.A. Anderson, *Determination of Parent and Substituted Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in High-Fat Salmon Using a Modified QuEChERS Extraction, Dispersive SPE and GC–MS*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**(15): p. 8108-8116.

22. Uhl, M., *Determination of drugs in hair using GC/MS/MS*. Forensic Science International, 1997. **84**(1–3): p. 281-294.
23. Zheng, X., et al., *Plasma fatty acids metabolic profiling analysis of coronary heart disease based on GC–MS and pattern recognition*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2009. **49**(2): p. 481-486.
24. Warwick, S.I. and C.A. Sauder, *Phylogeny of tribe Brassiceae (Brassicaceae) based on chloroplast restriction site polymorphisms and nuclear ribosomal internal transcribed spacer and chloroplast trnL intron sequences*. Canadian Journal of Botany, 2005. **83**(5): p. 467-483.
25. IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.
26. VISHAL T. APARADH*, RAHUL J. MAHAMUNI AND B. A. KARADGE. 2012. TAXONOMY AND PHYSIOLOGICAL STUDIES IN SPIDER FLOWER (CLEOME SPECIES): A CRITICAL REVIEW. Plant Sciences Feed , 2 (3): 26-46.
27. Annamaria Giorgi, Sara Panzeri, Niranjala Nanayakkarawasam Masachchige Chandrika Nanayakkara, Luca Maria Chiesa. 2012. HS-SPME-GC/MS Analysis of the Volatile Compounds of Achillea collina: Evaluation of the Emissions Fingerprint Induced by Myzus persicae Infestation. J. Plant Biol. 55:251-260;
28. Laura Kļaviņa, Oskars Bikovens, Iveta Šteinberga, Viktorija Maksimova, Linda Eglīte. 2012. Characterization of chemical composition of some bryophytes common in Latvia. Environmental and Experimental Biology (2012) 10: 27–34
29. Robert A. Raguso, Boris O. Schlumpberger, Rainee L. Kaczorowski, Timothy P. Holtsford. 2006. Phylogenetic fragrance patterns in Nicotiana sections Alatae and Suaveolentes. Phytochemistry 67: 1931–1942